

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

Tesis Doctoral

**Búsqueda y caracterización de nuevos factores implicados
en represión catabólica en *Pseudomonas putida***

María Pilar Fonseca García

Centro Nacional de Biotecnología (CSIC)

Madrid 2011

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

**Búsqueda y caracterización de nuevos factores implicados
en represión catabólica en *Pseudomonas putida***

**Memoria presentada por María Pilar Fonseca García para optar al grado
de Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid.**

Directores de Tesis:

Dr. Fernando Rojo de Castro

Dra. Renata Moreno Albíger

Este trabajo ha sido realizado gracias a una beca predoctoral del programa
FPU del Ministerio de Educación.

A mi familia

A Pablo

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi agradecimiento al Dr. Fernando Rojo de Castro y a la Dra. Renata Moreno Albíger por permitirme realizar este trabajo bajo su dirección, por todo el apoyo brindado, por su confianza y dedicación.

A mis compañeros de los laboratorios 216 y 212 del CNB por el buen ambiente de trabajo que he disfrutado estos años, por su valiosa ayuda y sus buenos consejos.

A la Dra. Inés Canosa, al Dr. Víctor de Lorenzo y al Dr. Juan Luis Ramos por la cesión de algunas de las cepas utilizadas en este trabajo.

A los servicios de Genómica y Proteómica del CNB.

Al programa de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación por la concesión de la beca para realizar la Tesis Doctoral.

A todas aquellas personas e instituciones que de alguna manera me han ayudado a llevar a cabo este proyecto.

1 ÍNDICE

ÍNDICE

1	ÍNDICE	1
2	RESUMEN	7
3	ABREVIATURAS	11
4	INTRODUCCIÓN	15
4.1	<i>Pseudomonas putida</i>	17
4.2	Represión catabólica	18
4.2.1	Represión catabólica en <i>Escherichia coli</i> y <i>Bacillus subtilis</i>	19
4.2.2	Represión catabólica en <i>Pseudomonas</i>	21
4.2.3	Otros factores que podrían afectar a la represión catabólica	27
5	OBJETIVOS	33
6	MATERIALES Y MÉTODOS	37
6.1	Cepas y plásmidos	39
6.2	Medios y condiciones de cultivo	40
6.3	Técnicas de ADN	41
6.3.1	Extracción y purificación de ADN	41
6.3.2	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa	41
6.4	Manipulaciones genéticas	41
6.4.1	Transformación de ADN	41
6.4.2	Obtención de estirpes mutantes	42
6.4.3	Oligonucleótidos	44
6.5	Técnicas de ARN	45
6.5.1	Extracción y purificación de ARN	45
6.5.2	Análisis del transcriptoma mediante <i>microarrays</i> genómicos	46
6.5.3	RT-PCR en tiempo real	47
6.6	Análisis de proteínas	50
6.6.1	2D-DIGE	50
6.6.2	<i>Western blotting</i>	51

6.7	Ensayos de actividad β -galactosidasa	52
6.8	Recuento de células viables	53
6.9	Ensayos de <i>swimming</i>	53
6.10	Ensayos de golpe de frío	53
7	RESULTADOS	55
7.1	La RNasa R: su función en represión catabólica y en el procesamiento de los ARNs mensajeros.	57
7.1.1	Efecto de la ausencia de la RNasa R sobre la represión catabólica ejercida sobre la ruta de degradación de alcanos	57
7.1.2	Efecto de la ausencia de la RNasa R sobre el transcriptoma en células creciendo exponencialmente en medio rico a 30°C.	59
7.1.3	Validación de los resultados de los <i>microarrays</i>	61
7.1.4	La RNasa R y el sistema flagelar: la cepa KTRNR1 está dotada de mayor motilidad.	63
7.1.5	La RNasa R afecta de forma directa a la estabilidad de algunos ARNs mensajeros.	64
7.1.6	La inactivación del gen <i>rnr</i> provoca dificultades en el crecimiento a 10°C, pero no a 30°C.	66
7.1.7	Respuesta compensatoria en ausencia de la RNasa R	67
7.1.8	Expresión de la RNasa R en diferentes condiciones	68
7.2	Crecimiento de <i>P. putida</i> a baja temperatura	70
7.2.1	Comparación del transcriptoma de células creciendo en medio rico a 10°C o a 30°C	71
7.2.2	Validación de los resultados de los <i>microarrays</i>	72
7.2.3	Comparación del proteoma de células creciendo en medio rico a 10°C o a 30°C	74
7.2.4	Efecto de la temperatura sobre el transcriptoma y el proteoma de <i>P. putida</i>	77
7.3	Represión catabólica a baja temperatura	102
7.3.1	Un tercio de los genes expresados diferencialmente en un mutante en el gen <i>crc</i> a 30°C también se ven afectados cuando la célula crece a baja temperatura	103
7.3.2	Efecto del crecimiento a baja temperatura sobre la represión catabólica que inhibe la inducción de las rutas de degradación de alcanos y de benzoato	109
7.3.3	Análisis transcriptómico del efecto del regulador Crc en células creciendo a 10°C	112

7.3.4	Posibles causas de la disminución de la represión catabólica a baja temperatura	113
7.3.5	Inactivación del RNA pequeño CrcZ y su efecto en represión catabólica.	120
7.3.6	La sobreexpresión de CrcZ libera la represión catabólica existente en la ruta de benzoato a 30°C y a 10°C	123
8	DISCUSIÓN	127
8.1	Función de la RNasa R en <i>P. putida</i> y su posible implicación en represión catabólica	129
8.2	Análisis global de la adaptación a bajas temperaturas de <i>P. putida</i>	134
8.3	Represión catabólica a bajas temperaturas	139
9	CONCLUSIONES	145
10	BIBLIOGRAFÍA	149
11	ANEXO I: INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA	161
11.1	Tabla de datos de transcriptómica del mutante en la RNasa R comparado con KT2440	163
11.2	Tabla de datos de transcriptómica del crecimiento a 10°C comparado con 30°C	175
11.3	Tabla de datos de proteómica del crecimiento a 10°C comparado con 30°C	187
11.4	Transcriptómica de la cepa mutante KTCRC a baja temperatura comparada con la cepa silvestre KT2440 también a 10°C	195
12	ANEXO II: ARTÍCULOS PUBLICADOS	199

2 RESUMEN

SUMMARY

Pseudomonas putida is a ubiquitous Gram negative bacteria characterized for its metabolic versatility and its ability to thrive in different environments, such as soil, water or the rhizosphere, even when these sites are polluted by different contaminants. Its capacity to utilize many different compounds as carbon source is tightly regulated by complex global regulation networks. Some of these regulatory systems are responsible for the preferential assimilation of one or more compounds when several potential carbon sources are present in the medium. This implies the repression of the genes coding for the metabolic pathways of less preferred compounds, a process called Carbon Catabolite Repression (CCR). The understanding of the mechanisms underlying CCR is important to learn how this bacterium behaves in its natural environments, and to optimize the applications of this microorganism in biotechnology, for example in bioremediation or agriculture. In this work, we have analysed the possible role of two factors in Carbon Catabolite Repression in *P. putida*: the RNase R and low growth temperatures.

RNase R has been previously proposed to participate, together with Crc (a well known global regulator of CCR in *Pseudomonas*), in the repression in rich media of the expression of BkdR, a transcriptional regulator of the branched-chain amino acids assimilation pathway. We have studied the global role of this exoribonuclease in catabolite repression as well as the effect of the inactivation of this enzyme in the phenotype and transcriptome of *P. putida*. We have found that this ribonuclease is not relevant for catabolite repression, but has an important role in the degradation and turnover of mRNAs in this bacterium.

In *P. fluorescens*, the catabolite repression exerted by malate on the glucose assimilation pathway is known to be relieved at low temperature. To investigate whether growth temperature has a general role in catabolite repression, we have compared the transcriptome and proteome profiles of *P. putida* growing exponentially in a rich media at either 10°C or 30°C. We found that low temperature has a deep impact on the gene expression pattern of the cells. Many changes are devoted to cope with the problems generated by low temperature. Interestingly, we found that the catabolite repression that inhibits expression of many genes related with the transport and metabolism and of diverse compounds is relieved when cells grow at 10°C. We have investigated the mechanisms underlying this effect.

3 ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

Las abreviaturas utilizadas a largo de esta Tesis se describen a continuación:

- **ADN:** ácido desoxirribonucleico
- **AMPc:** adenosín-3',5'-monofosfato cíclico
- **Ap:** ampicilina
- **ARN:** Ácido ribonucleico
 - **ARNm:** ARN mensajero
 - **ARNp:** ARN pequeño
 - **ARNr:** ARN ribosomal
- **C:** centígrado
- **CAT:** Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
- **DCPK:** diciticlopropilcetona
- **DIGE:** del inglés *difference In-gel electrophoresis* (electroforesis diferencial en gel)
- **D.O. :** densidad óptica
- **EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético
- **FDR:** del inglés *False Discovery Rate* (tasa de descubrimiento de falsos positivos)
- **h:** hora
- **HRP:** del inglés *Horseradish Peroxidase* (peroxidasa de rábano)
- **IPTG:** isopropil-β-D-tio-galactopiranósido
- **Km:** kanamicina
- **LB:** medio de cultivo rico Luria-Bertani
- **MALDI/TOF:** del inglés *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization* (desorción/ionización láser asistida por matriz) y *Time of Fligth* (tiempo de vuelo)
- **min:** minuto
- **MQ:** Milli-Q
- **MS/MS:** espectrometría de masas en tándem
- **NAD⁺/NADH:** nicotinamida-adenín-dinucleótido oxidado/reducido
- **O/N:** del inglés overnight (toda la noche)
- **ONPG:** o-nitrofenil-β-D-galactopiranósido
- **PAGE:** del inglés *polyacrylamide gel electrophoresis* (electroforesis en gel de poliacrilamida)
- **PCR:** del inglés *Polimerase Chain Rreaction*, Reacción en cadena de la Polimerasa

Abreviaturas

- **PTS:** sistema de transporte fosfotransferasa
- **PVDF:** fluoruro de polivinilideno
- **RC:** represión catabólica
- **Rf:** rifampicina
- **rpm:** revoluciones por minuto
- **s:** segundo
- **SDS:** dodecilsulfato sódico
- **Sm:** estreptomicina
- **T^a:** temperatura
- **TAE:** disolución tampón Tris-acetato-EDTA
- **TBS:** tampón Tris salino
- **Tc:** tetraciclina
- **Tris:** tris(hidroximetil)aminometano
- **UFC:** Unidades formadoras de colonias
- **X-Gal:** 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranósido

4 INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

4.1 *Pseudomonas putida*

Las bacterias del género *Pseudomonas* son bacilos Gram negativos pertenecientes al grupo de las gamma proteobacterias. La característica principal de estos microorganismos es su gran versatilidad metabólica, que permite que sean capaces de sobrevivir en suelos, agua, rizosfera y que algunas especies sean patógenos de plantas y animales. De hecho, miembros de este género pueden utilizar más de 100 compuestos diferentes como fuente de carbono, incluyendo sustancias tóxicas como diversos hidrocarburos aromáticos y alifáticos. Además, ciertas especies son resistentes a desinfectantes, antibióticos y detergentes, entre otros (44, 46, 124, 146). Dentro de este género destaca *Pseudomonas putida*, un organismo no patógeno capaz de vivir en suelos, agua dulce y rizosfera (44, 46, 146, 157). Este microorganismo es un paradigma de versatilidad metabólica y tiene gran importancia en el mantenimiento del medio ambiente, especialmente del suelo (44, 146). La cepa *P. putida* KT2440, que deriva de la estirpe mt-2 (12, 126), es una bacteria no patógena, apta para las manipulaciones en laboratorio (44, 146), que ha mantenido la capacidad de sobrevivir en el medio ambiente y cuyo genoma está secuenciado (108). Por todas estas razones, se ha convertido en un organismo modelo para estudios en biodegradación, adaptación a diversos ambientes y para el desarrollo de herramientas biotecnológicas (44, 118, 157).

P. putida KT2440 posee un genoma de 6,2 Mb. Su metabolismo incluye, entre otras, rutas catabólicas para la degradación de diversos compuestos aromáticos derivados de la lignina. También están presentes en su genoma varias dioxigenasas, monooxigenasas y oxidorreductasas, enzimas que son importantes para la degradación de compuestos recalcitrantes. Además, se han anotado más de 350 sistemas de transporte en la membrana citoplasmática, dato coherente con su capacidad de metabolizar gran cantidad de compuestos diferentes. Sin embargo, sólo posee un sistema de transporte de azúcares tipo PTS (sistema de transporte fosfotransferasa), específico para la fructosa. La coordinación de toda esta versatilidad metabólica y capacidad adaptativa requiere redes de regulación complejas. De hecho, el 10% del genoma está implicado en regulación génica o en transducción de señales. Se han detectado 24 factores sigma y

135 sistemas de transducción de señales de dos componentes. Para hacer frente a los cambios producidos en el ambiente, *P. putida* KT2440 tiene genes que codifican proteínas de estrés universal, proteínas de golpe de calor y de frío, así como sistemas de respuesta a estrés oxidativo (44, 108, 163). Además de las rutas catabólicas codificadas en el genoma, algunas estirpes de *P. putida* tienen otras codificadas en plásmidos, como por ejemplo, la ruta de degradación de tolueno del plásmido TOL pWW0 ó la ruta de degradación de alcanos del plásmido OCT (130, 146).

Por lo tanto, es necesario entender el funcionamiento de los mecanismos de regulación que coordinan la extraordinaria versatilidad este microorganismo, particularmente a nivel metabólico, y utilizar este conocimiento para las posteriores aplicaciones de esta bacteria en biotecnología, biorremediación, agricultura, etc.

4.2 Represión catabólica

Como ya se ha comentado anteriormente, las bacterias del género *Pseudomonas* pueden vivir en gran variedad de ecosistemas diferentes. Esto es debido, en parte, a su gran versatilidad metabólica, que les permite utilizar muchos compuestos diferentes como fuente de carbono (44, 146). Sin embargo, para conseguir un crecimiento más rápido y poder competir con el resto de especies presentes en su entorno, la bacteria debe ser capaz de elegir los compuestos más adecuados como fuente de carbono entre todos aquellos que estén presentes en el medio (59, 129). Por ello, el metabolismo de la bacteria tiene que estar sometido a un control estricto y a la vez flexible. Este proceso mediante el cual las células asimilan preferentemente un compuesto de entre varias posibles fuentes de carbono disponibles, se denomina represión catabólica (RC). Esta regulación se engloba dentro de lo que se conoce como control del catabolismo del carbono (CCC), ya que, para que se metabolice un compuesto en favor de otro también presente en el medio, es necesaria la coordinación de varias rutas metabólicas, aumentando la expresión de algunas y reprimiendo otras (129).

La represión catabólica, por lo tanto, es un proceso muy complejo que requiere, en muchos casos, la represión de un gran número de genes. Esta coordinación la proporcionan redes de regulación global que, a través de reguladores globales, controlan la expresión de múltiples rutas metabólicas al mismo tiempo. Es interesante destacar que se ha visto que estas redes de

regulación afectan a otros procesos fisiológicos no metabólicos como, por ejemplo, la expresión de factores de virulencia en microorganismos patógenos (59). Por otra parte, el fenómeno de RC está muy extendido entre las bacterias, especialmente las de vida libre y con metabolismo versátil. Sin embargo, los mecanismos moleculares mediante los cuales se produce parecen ser muy diferentes entre especies (129).

4.2.1 Represión catabólica en *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*

El fenómeno de represión catabólica se ha estudiado principalmente para los organismos modelo *E. coli* y *B. subtilis*. La fuente de carbono preferida por ambas bacterias es la glucosa, de forma que, cuando hay otras fuentes de carbono en el medio además de glucosa, ésta es la que se metaboliza primero.

De forma resumida y simplificada, en *E. coli*, el sistema de represión catabólica se basa en componentes del sistema de transporte de glucosa, concretamente en el estado de fosforilación de la proteína $EIIA^{Glc}$, y en la actividad del enzima adenilato ciclasa (Figura 1A). $EIIA^{Glc}$ es una proteína que forma parte del sistema PTS (sistema fosfotransferasa fosfoenolpiruvato-carbohidrato). Este sistema acopla el transporte de glucosa con su fosforilación. El grupo fosfato se transfiere desde el fosfoenolpiruvato hasta el azúcar a través de diversas enzimas entre las que se encuentra $EIIA^{Glc}$. En presencia de glucosa, $EIIA^{Glc}$ se encuentra principalmente en la forma no-fosforilada, ya que el grupo fosfato pasa al azúcar para formar glucosa-6-fosfato. En esta situación, esta enzima interacciona con los transportadores de carbohidratos como lactosa o maltosa, que no utilizan el sistema PTS, impidiendo su entrada a la célula. Cuando se agota la glucosa en el medio, la enzima $EIIA^{Glc}$ se encuentra principalmente en la forma fosforilada y es capaz de estimular, junto con otro factor aún desconocido, la adenilato ciclasa, generándose AMPc. El AMPc interacciona con la proteína CRP (proteína receptora de AMPc) permitiendo que dimerice, se una al ADN y regule la transcripción de diferentes operones relacionados con catabolismo (59, 129).

En *B. subtilis* la glucosa es también el sustrato preferente. Aunque, al igual que en *E. coli*, el control catabólico depende de componentes del sistema PTS de transporte de glucosa, los mecanismos moleculares son diferentes (Figura 1B). De forma muy simplificada, cuando se metaboliza glucosa, aumentan los niveles del metabolito fructosa-1,6-difosfato,

estimulando la fosforilación de la proteína HPr en la serina 46 a través de la enzima HPr quinasa/fosforilasa (HPrK). HPr es un elemento del sistema PTS que, cuando está fosforilado en la serina 46, es capaz de unirse a la proteína CcpA. El complejo CcpA-P-Ser-HPr se une al ADN en las denominadas regiones *cre* (elementos de respuesta catabólica) reprimiendo la expresión de muchos genes catabólicos. Además de HPr, en *Bacillus* existe otra proteína similar denominada Crh que también interviene en represión catabólica así como otras proteínas de control catabólico independientes de CcpA (56).

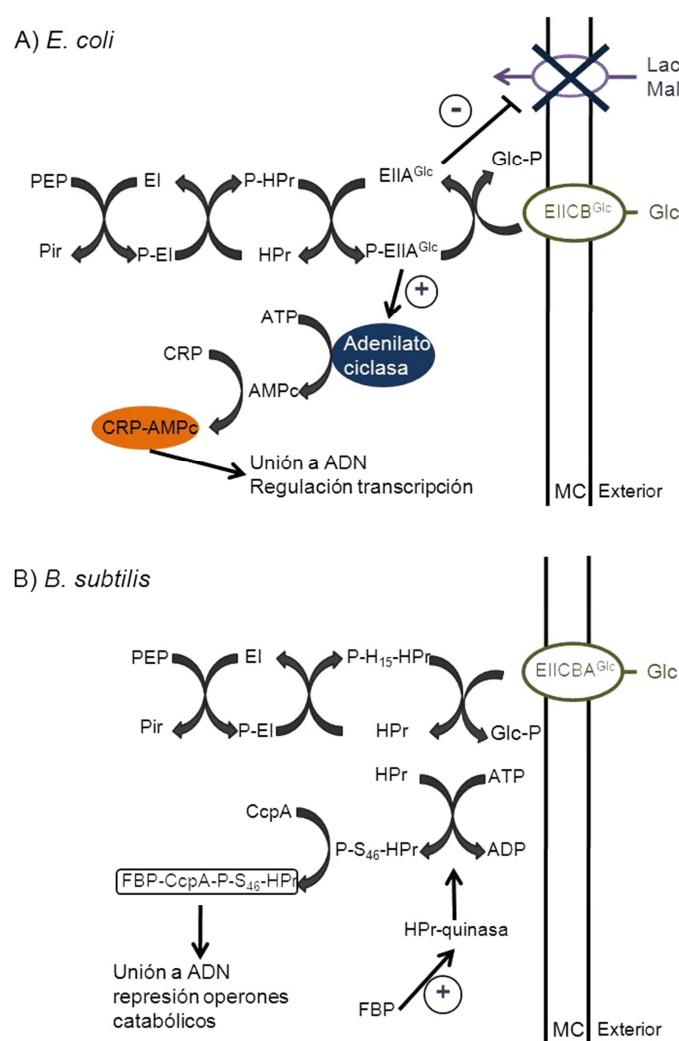


Figura 1. Modelo esquemático del transporte de glucosa (Glc) y represión catabólica en *E. coli* y *B. subtilis* (adaptado de Rojo, 2010 (129)). MC: membrana celular, PEP: fosfoenolpiruvato, Pir: piruvato. A) En *E. coli*, el responsable último de la represión catabólica es el estado de fosforilación de la proteína EIIA^{Glc}, un componente del

sistema PTS^{Glc}. Cuando no está fosforilado (porque hay mucha glucosa disponible) EIIA^{Glc} interacciona con los transportadores de otros azúcares como lactosa (Lac) o maltosa (Mal), impidiendo su entrada. Cuando no hay glucosa, la forma predominante es P-EIIA^{Glc}, que permite el transporte de otros azúcares induciéndose las respectivas rutas catabólicas. Además, se estimula la síntesis de AMPc, que permite que la proteína CRP dimerice y estimule la inducción de rutas de degradación de azúcares alternativos a la glucosa. B) En *B. subtilis*, HPr es la responsable del fenómeno de represión catabólica. Cuando hay glucosa disponible, se fosforila en Ser-46, que interacciona con la proteína CcpA. Este complejo inhibe la transcripción de aquellas rutas metabólicas para la asimilación de azúcares alternativos que contengan la secuencia diana denominada *cre*.

4.2.2 Represión catabólica en *Pseudomonas*

El género *Pseudomonas*, a diferencia de *Enterobacteria* o *Firmicutes*, no utiliza la glucosa como fuente de carbono preferente. Metaboliza en primer lugar determinados ácidos orgánicos o aminoácidos. Estas diferencias metabólicas entre géneros pueden derivar de las distintas estrategias de supervivencia adoptadas por cada microorganismo. Por ejemplo, las fuentes de carbono disponibles para *Pseudomonas* cuando se encuentra en la rizosfera, provienen de los exudados de las raíces de las plantas: ácidos orgánicos, azúcares, aminoácidos, ácidos grasos, bases nitrogenadas. En el suelo, puede utilizar aminoácidos, azúcares, ácidos orgánicos, etc; derivados de la descomposición de animales o plantas....(129). Por lo tanto, no es extraño que el metabolismo se coordine en *Pseudomonas* por mecanismos de regulación global diferentes a los de los organismos citados anteriormente. Hasta el momento, se han descrito tres sistemas relacionados con el fenómeno de represión catabólica en *Pseudomonas* que dependen, respectivamente, de la proteína Crc, la oxidasa terminal Cyd, y el sistema PTS^{Ntr}.

4.2.2.1 El regulador global Crc

La proteína Crc (Catabolite Repression Control) se describió por primera vez en *P. aeruginosa* en 1991. Cepas con el gen *crc* inactivado mostraban liberación de la represión ejercida en diversas rutas metabólicas en presencia de succinato y de los correspondientes inductores (162). Desde

entonces, se ha descrito que Crc es un regulador global del metabolismo que actúa inhibiendo la expresión de muchas rutas metabólicas en presencia de sustratos preferentes. Concretamente, en *P. putida*, Crc está implicado en la represión del operón de asimilación de aminoácidos ramificados *bkd* (67, 68), de la ruta de degradación de alcanos del plásmido OCT (167), de las rutas de degradación de benzoato, 4-hidroxibenzoato y 4-hidroxifenilpiruvato (97, 102), o de la ruta de degradación de tolueno localizada en el plásmido pWW0 (6, 37, 99), entre otras. Recientemente, un estudio global del regulón Crc en células creciendo en medio rico LB a 30° C ha desvelado que, en estas condiciones, Crc controla la expresión de, al menos 134 genes, en su mayoría relacionados con transporte y metabolismo de diversos compuestos (100). El medio LB está formado principalmente por aminoácidos y oligopéptidos, que son fuentes de carbono preferidas para *P. putida*, aunque también contiene, en menor medida, azúcares (136). Sin embargo, aunque en este medio están disponibles todos los aminoácidos, se ha visto que su asimilación está jerarquizada en células creciendo exponencialmente a 30° C. Es decir, no todos los aminoácidos son sustratos preferidos en estas condiciones, sino que se metabolizan primero unos y, cuando se agotan, se utilizan los restantes. En estas condiciones, está favorecido el transporte y la asimilación de prolina, alanina, glutamina, ácido glutámico e histidina; además, en el caso de aminoácidos que pueden asimilarse por distintas rutas, como arginina, lisina, asparagina, y ácido aspártico, se fomentan unas rutas respecto a otras. Finalmente, se reprime la asimilación de aminoácidos como la valina, leucina, isoleucina, treonina, fenilalanina, tirosina, glicina y serina, así como de distintos azúcares (100). La proteína Crc juega un papel importante en la regulación de este proceso, lo que confirma su importancia en la coordinación del metabolismo en *P. putida*. En *P. aeruginosa*, Crc no sólo controla muchos procesos de represión catabólica, sino que tiene una clara influencia en otros aspectos como la susceptibilidad a antibióticos o la virulencia de la bacteria (86). En cualquier caso, parece claro que la función de Crc es integrar señales derivadas del estatus nutricional con la regulación de genes que tienen una función importante en la adaptación de la bacteria a su hábitat.

4.2.2.1.1 Mecanismo de acción de Crc

Crc tiene similitud con la familia de proteínas Endonucleasas-Exonucleasas-Fosfatasas. Sin embargo, se ha comprobado que no se une a ADN ni tiene capacidad endonucleasa (91). También se ha comprobado que,

al menos en el caso de gen *alkS*, no modifica de forma directa la estabilidad de los ARNs mensajeros que regula (167). Crc regula la expresión génica a nivel postranscripcional, uniéndose a dianas específicas en el ARNm que están cerca del sitio de unión del ribosoma, impidiendo la formación de un complejo de inicio de la traducción funcional (101, 103). Este mecanismo se ha estudiado en profundidad en la ruta de degradación de alcanos del plásmido OCT y en la ruta de degradación del benzoato. El mecanismo de acción de Crc está resumido en la (Figura 2)

Los genes de la ruta metabólica para la degradación de alcanos presente en el plásmido OCT se agrupan en dos operones, *alkBFGHJKL* y *alkST*. AlkS es un activador transcripcional que, en presencia de alcanos, activa la transcripción de los dos operones desde los promotores *PalkB* y *PalkS2* (130). Cuando las células crecen en medio rico, esta ruta está sometida a un control global que inhibe la inducción por AlkS aunque haya alcanos presentes en el medio. Esta represión está mediada por Crc (167) y por la oxidasa terminal Cyo (41, 42). El ARNm de *alkS* tiene una pequeña región rica en A desapareadas (AAUAAUAA) justo a continuación del codón de inicio de la traducción AUG. Ésta secuencia es reconocida por Crc de forma que, al unirse a ella, impide la traducción del ARNm. Esto reduce los niveles de la proteína activadora AlkS, que está siempre en concentraciones limitantes. La consecuencia es que la transcripción de los operones *alkBFGHJKL* y *alkST* se reduce significativamente porque no hay suficiente AlkS (101).

La ruta de degradación del benzoato, de forma esquemática, se divide en tres partes, los genes *ben*, que transforman el benzoato en catecol, los genes *cat*, que transforman el catecol en β -cetoadipato-enoil-lactona, y los genes *pca*, que permiten la transformación de este último compuesto en acetil-CoA y succinil-CoA, que pasan al ciclo de Krebs. La expresión del operón *benABCD* requiere la presencia del inductor benzoato y el activador transcripcional *benR*. Los niveles de BenR, y por lo tanto indirectamente del operón *benABCD*, están sometidos a un nivel superior de regulación mediado por Crc (97, 102). Al igual que en el caso de AlkS, el ARNm de *benR* presenta una región sin aparear con la secuencia AACAAUAA, en este caso un poco antes del codón de inicio de la traducción AUG. La proteína Crc puede unirse a esta secuencia, inhibiendo la traducción del ARNm (101). Al impedirse la traducción de *benR*, no se expresarían los genes *benABCD* y, ni tampoco los *cat*, ya que su inducción se produce por los metabolitos generados por BenABCD. De esta forma, en presencia de una fuente de

carbono preferida no se metaboliza benzoato aunque esté presente en el medio (101, 102).

La identificación y caracterización de la zona de unión de Crc al ARNm de *alkS* y la identificación de otra región en *benR* permitió establecer una secuencia consenso (101). Al buscar esta secuencia en los ARNm correspondientes a las proteínas cuyos niveles variaban al inactivar el gen *crc* en células creciendo en medio LB a 30°C, según los análisis de proteómica diferencial (100), se localizaron 20 genes que presentaban posibles dianas para Crc en la zona de unión del ribosoma (101). Sin embargo, un análisis bioinformático de posibles dianas para Crc en diferentes especies de *Pseudomonas* ha localizado casi 300 genes en *P. putida* que contienen esta secuencia. Además, este estudio ha desvelado que algunas dianas son comunes para todos los miembros del género analizados, y generalmente están presentes en genes relacionados con el transporte y metabolismo de fuentes de carbono (18). Sin embargo, muchas otras dianas son específicas de especie, o incluso podrían ser específicas de una estirpe en particular, y están localizadas en genes importantes para la supervivencia de esta especie en concreto en su hábitat específico.

Los niveles de Crc observados en diferentes condiciones de crecimiento se corresponden con el nivel de represión catabólica ejercida sobre la ruta de degradación de alcanos, donde la represión es máxima en medio LB y fase exponencial a 30° C y disminuye al entrar en fase estacionaria. Asimismo, en medio mínimo con citrato como fuente de carbono, donde apenas hay represión catabólica, los niveles de Crc son menores que en medio LB. Sin embargo, cuando se expresa Crc a niveles mayores que los fisiológicos en LB a 30° C, sólo pueden mantener la represión durante la fase exponencial, liberándose al llegar a fase estacionaria, aun cuando la cantidad de Crc sigue siendo alta, indicando que la variación de los niveles de Crc no es suficiente para explicar el proceso de represión catabólica (133). Por otra parte, la señal metabólica a la que responde Crc todavía se desconoce.

Durante el desarrollo de esta Tesis, en la zona intergénica entre los genes *crbB* y *pcnB* de *P. aeruginosa* se descubrió un ARN pequeño con 5 posibles dianas para Crc. Los niveles de este ARNp son mayores en las condiciones en las que no hay represión catabólica, como por ejemplo crecimiento en medio mínimo con glucosa o manitol como fuente de carbono, y menores cuando hay presente una fuente de carbono preferida como el succinato. La expresión de CrcZ, además, depende positivamente de CbrB y

del factor sigma RpoN (140). CbrB es el regulador de respuesta del sistema de dos componentes CbrA-CbrB y, en *Pseudomonas*, es necesario para el crecimiento en diferentes aminoácidos y otras fuentes de carbono y nitrógeno (3, 110). Además, en *P. putida* se ha descrito también que CbrB está implicado en estrés y formación de biofilm (3). Aunque la señal a la que responde este sistema sensor-regulador se desconoce, se sospecha que puede responder a cambios en la relación carbono/nitrógeno (110).

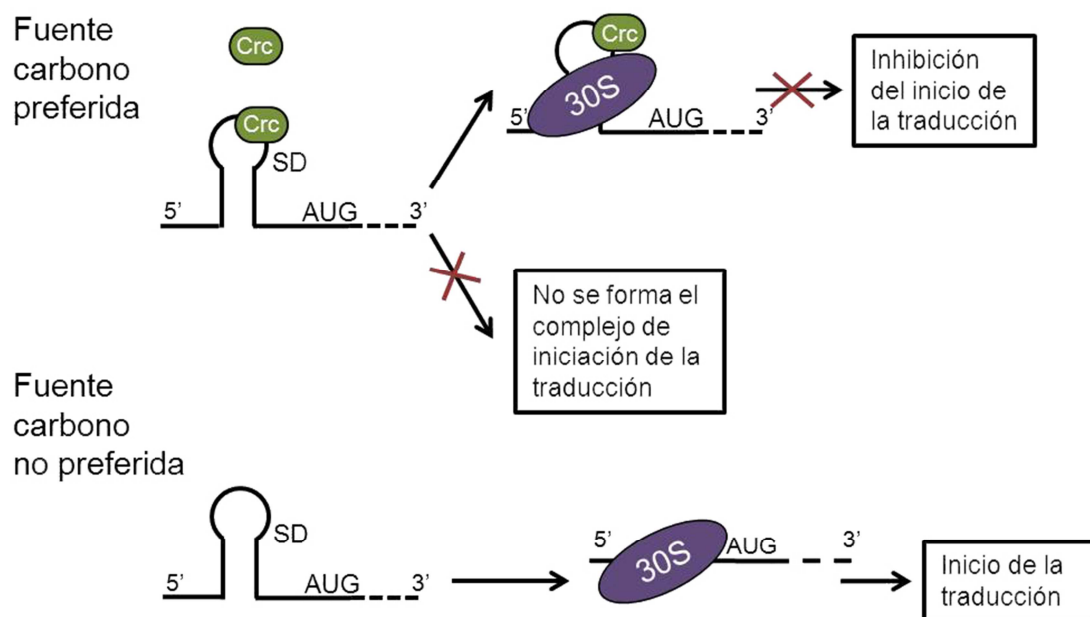


Figura 2. Mecanismo de acción de la proteína Crc (adaptado de(101, 129)). Crc reconoce y se une a una diana específica presente en algunos ARNm, localizada cerca del codón de inicio de la traducción. De esta forma, Crc impide la formación de un complejo de iniciación activo, bien porque la subunidad 30S no puede acceder al ARNm, o bien porque sí accede pero no puede formar un complejo activo.

4.2.2.2 La oxidasa terminal Cyo

Otro factor implicado en regulación global del metabolismo en *P. putida* es la citocromo o ubiquinol oxidasa Cyo. Se trata de una de las oxidasas terminales que forman parte de la cadena de transporte de electrones de este microorganismo. Cuando Cyo está ausente, disminuye la represión catabólica ejercida sobre la ruta de degradación del fenol codificada en el plásmido pPGH1 de *P. putida* H (115) y sobre la ruta de degradación de alcanos del plásmido OCT de *P. putida* Gpo1 (42). Los miembros del género *Pseudomonas* poseen varias oxidasas terminales (119). En *P. putida* KT2440, concretamente, se han descrito las oxidasas terminales Cyo, Cbb3-1, Cbb3-2, CIO y Aa3 (98, 108). Sin embargo sólo Cyo parece estar involucrada en represión catabólica (98).

Los niveles de expresión de los genes que codifican para la oxidasa Cyo varían dependiendo de las condiciones de cultivo. Por ejemplo, la expresión es elevada en medio rico, en presencia de oxígeno y en fase exponencial, disminuyendo al llegar a fase estacionaria. La expresión también es alta cuando las células crecen en fuentes de carbono que generan represión catabólica, como succinato. Este patrón de expresión se corresponde con los niveles de represión catabólica que afectan a la ruta de degradación de alcanos en esas condiciones (42, 98). De hecho, la represión catabólica ejercida sobre esta ruta cuando las células crecen en un medio mínimo con succinato como fuente de carbono está mediada principalmente por Cyo (41, 42). Sin embargo, como los niveles de Cyo dependen también de la concentración de oxígeno en el medio, es más correcto hablar de regulación global que de represión catabólica (41). De hecho, un estudio del transcriptoma de una cepa deficiente en el gen *cyoB* ha revelado que la ausencia de Cyo modifica la expresión de más de 100 genes en células creciendo exponencialmente en LB (98). Al comparar estos genes con los del regulón Crc, apenas hay coincidencias, lo que sugiere que se trata de dos sistemas de regulación global independientes (129). Este argumento se confirma con el hecho de que el efecto de Crc y de Cyo sobre la expresión de la ruta de degradación de alcanos es aditivo (42).

La regulación de la expresión de los genes que codifican para la oxidasa Cyo es compleja. Hasta el momento, se sabe que el regulador global ANR inhibe la expresión de los genes *cyo* en *P. putida* en condiciones limitantes de oxígeno (150) y que RoxR actúa como activador en condiciones

de baja aireación (149). Sin embargo, se piensa que hay más factores involucrados que aún se desconocen.

En resumen, Cyo posee dos funciones. Por un lado se trata de una oxidasa terminal, y por otro pertenece a un sistema de regulación global capaz de integrar señales sobre la actividad de la cadena de transporte de electrones, aireación, y/o estado redox, y provocar una respuesta metabólica adecuada para adaptarse a cada situación.

4.2.2.3 El sistema PTS^{Ntr}

Además de los factores de represión catabólica comentados anteriormente, existe un sistema fosfotransferasa formado por las proteínas PtsP, PtsO y PtsN en el que el grupo fosfato se transmite desde el fosfoenolpiruvato a PtsP, de éste a PtsO y de aquí hasta PtsN. Las proteínas que componen este sistema, que se denomina PTS^{Ntr}, son homólogas a las de los sistemas PTS implicados en el transporte de algunos azúcares (fructosa en *P. putida*). Sin embargo, a diferencia de estos últimos, no parece que el grupo fosfato termine transfiriéndose a ningún sustrato. Más bien, las evidencias disponibles sugieren que PTS^{Ntr} es un sistema de transducción de señales que relaciona la regulación del metabolismo de nitrógeno con la del carbono. En *Pseudomonas*, el sistema PTS^{Ntr} está relacionado con la acumulación de polihidroxialcanoatos y con la represión catabólica mediada por glucosa que afecta a la ruta de degradación de tolueno del plásmido pWW0 (116, 129). Este sistema no parece afectar a la expresión de otras rutas catabólicas como la de alcanos del plásmido OCT, o la del benzoato.

4.2.3 Otros factores que podrían afectar a la represión catabólica

En la bibliografía se han descrito indicios de la existencia de otros factores, diferentes a los citados anteriormente, que podrían estar implicados o afectar al fenómeno de represión catabólica en *Pseudomonas*. Sin embargo, no se ha profundizado en su estudio. Esta Tesis se ha centrado en dos de estos ejemplos: la RNasa R y las bajas temperaturas de crecimiento. A continuación se describe brevemente lo que se conoce sobre ellos.

4.2.3.1 La RNasa R

En un trabajo dirigido a encontrar factores implicados en la represión catabólica que afecta a los genes de asimilación de aminoácidos ramificados de *P. putida*, utilizando mutagénesis con transposones, se aislaron dos mutantes de inserción que tenían claramente disminuida la represión catabólica (67). De las dos mutaciones encontradas, una afectaba al gen *crc*, y otra a la RNasa R. Los autores se centraron en la proteína Crc, pero no analizaron la implicación de la RNasa R en el proceso. Por otra parte, también se ha descrito que, en *E. coli*, los niveles de esta enzima fluctúan según las condiciones de cultivo, en condiciones de estrés y al entrar en fase estacionaria (24, 25). Ambos indicios invitan a pensar que la RNasa R podría tener una función importante en regulación global.

La RNasa R es una enzima esencial para el crecimiento de *Pseudomonas syringae*, de *P. putida* y de *Legionella pneumophila* bajo condiciones de baja temperatura (123, 127, 139). Además, en *P. syringae* sustituye a la PNPasa como componente del degradosoma (122). En el caso de *E. coli*, la inactivación del gen que codifica para la RNasa R (denominado *rnr* o *vacB*) no compromete la viabilidad de la bacteria. Sin embargo, un doble mutante en la RNasa R y la PNPasa no es viable (28, 29). La RNasa R se encuentra muy extendida en la naturaleza. De hecho, es la única exorribonucleasa presente en *Mycoplasma genitalium* y lleva a cabo procesos de maduración y de degradación de RNA (84). Además, en algunas bacterias patógenas como *Shigella flexneri* y *Aeromonas hydrophyla* se ha descubierto que la inactivación de esta RNasa conlleva una disminución de su patogenicidad (29, 45, 147).

Una de las características principales de esta enzima es su capacidad de degradar ARNs con una elevada proporción de estructura secundaria (27, 155). Esto se debe a que la RNasa R posee dos actividades, ya que es una RNasa y una helicasa al mismo tiempo (9). Seguramente por esta razón la RNasa R tiene un papel importante en el procesamiento del RNA ribosomal en *P. syringae* y *E. coli* (28, 123). Esta enzima también es activa sobre RNAs con secuencias repetitivas extragénicas palindrómicas (REP) (26). Los elementos REP son secuencias muy conservadas de unas 35 bases de longitud, que se repiten y que tienen capacidad para formar estructuras de tallo-lazo (7). En *E. coli*, se ha propuesto que la RNasa R y la PNPasa podrían ser responsables del procesamiento de este tipo de secuencias (26). La RNasa R también tiene un papel destacado en la trans-traducción, un

proceso que libera a los ribosomas atascados en mRNAs defectuosos, al tiempo que marca las proteínas incorrectas que se generan para su degradación por proteasas. La RNasa R es necesaria para la maduración y degradación de uno de los principales componentes de la trans-traducción, el tmRNA (69). Además, es la encargada de la degradación de los mRNAs defectuosos (128).

Sin embargo, hasta el momento la función de la RNasa R *in vivo* sólo se ha descrito en casos concretos, como algunos mRNAs que contienen secuencias REP (26), el tmARN (20, 69, 79, 128), *ompA* (4) o *rpsO* (5). No se ha descrito un análisis global del efecto de la inactivación del gen *rnr* sobre los ARNm de la célula ni tampoco se ha ahondado en el papel de la RNasa R como posible regulador global del metabolismo en *P. putida*.

4.2.3.2 Represión catabólica y bajas temperaturas

En Gram positivos existen algunos trabajos que relacionan el fenómeno de represión catabólica con el crecimiento a bajas temperaturas. Por ejemplo, en *Lactobacillus casei* y *B. subtilis* se ha observado que el sistema PTS de transporte de azúcares juega un papel importante en la respuesta a una bajada brusca de la temperatura. En *L. casei*, el sistema de represión catabólica es muy similar al de *B. subtilis* y sus principales protagonistas son también las proteínas HPr y CcpA (Figura 1). Al someter a este organismo a un descenso brusco de la temperatura la expresión de HPr y CcpA aumenta (96). En *B. subtilis*, la proteína HPr también se induce por choque térmico por frío (61).

En el caso de *Pseudomonas*, ya en el año 1978 se describió que, en *P. fluorescens*, la represión catabólica ejercida sobre la ruta de asimilación de la glucosa en presencia de ácidos orgánicos como el malato se libera cuando las células crecen a 5° C (89). Desde entonces, no tenemos constancia de que se haya estudiado en detalle la relación entre represión catabólica y temperatura de crecimiento en *Pseudomonas*.

La mayoría de los estudios sobre represión catabólica en *P. putida* se realizaron cultivando las células a la temperatura óptima de crecimiento, 30° C, aunque se sabe que esta bacteria puede crecer a temperaturas de hasta 4° C (127). En sus hábitats naturales *P. putida* debe enfrentarse muchas veces a temperaturas subóptimas de crecimiento, durante periodos de tiempo largo (invierno, agua). Conocer los mecanismos por los que *P. putida*

se adapta a crecer a bajas temperaturas, y las implicaciones que esto pueda tener en el fenómeno de represión catabólica, es fundamental para diversas aplicaciones biotecnológicas de este microorganismo, como biorremediación de suelos y agua o aplicaciones agronómicas. Por ejemplo, la biorremediación de zonas contaminadas con petróleo en regiones frías como Alaska, Canadá, Rusia, en donde hay cada vez más explotaciones petrolíferas, ha de realizarse necesariamente a temperaturas bajas (164). Es destacable también que muchas de las especies bacterianas aisladas de suelos polares contaminados por hidrocarburos pertenecen al género *Pseudomonas* (1). Sin embargo, en el momento de iniciarse esta Tesis había muy poca información disponible sobre la fisiología de *P. putida* a bajas temperaturas, y apenas nada sobre el fenómeno de represión catabólica en estas condiciones. Sin embargo, la adaptación de la fisiología a bajas temperaturas sí se ha descrito en otras especies bacterianas, como en *E. coli*, *B. subtilis* u otras bacterias modelo. A continuación, se resumen los aspectos generales de este proceso.

4.2.3.2.1 Aspectos generales de la adaptación de las bacterias a crecer a baja temperatura

La mayor parte de los estudios de crecimiento a baja temperatura se han realizado con *E. coli*. En esta bacteria, cuando se produce una bajada brusca de la temperatura lo primero que ocurre es una parada del crecimiento debida a la interrupción en la síntesis de proteínas (Figura 3). Al mismo tiempo, se inducen una serie de proteínas denominadas proteínas de golpe de frío. Ésta inducción se debe a que se traducen de forma preferente, en parte debido a una mayor estabilidad de los ARNm correspondientes a baja temperatura y a la presencia de dominios de golpe de frío en la región 5' no traducida, que favorecen el proceso de traducción. Además, intervienen otros factores como la proteína CspA, un aumento en la relación de los factores de iniciación respecto a los ribosomas, y los propios ribosomas (58, 62). Una vez que las células han conseguido adaptarse, la inducción de las proteínas de golpe de frío cesa y se restablece la síntesis normal de proteínas, aunque se modifica el patrón de expresión génica. Llegado este momento, las células empiezan a crecer otra vez, aunque más despacio. Este proceso de aclimatación suele prolongarse durante varias horas, dependiendo de la temperatura (58, 62, 117, 145).

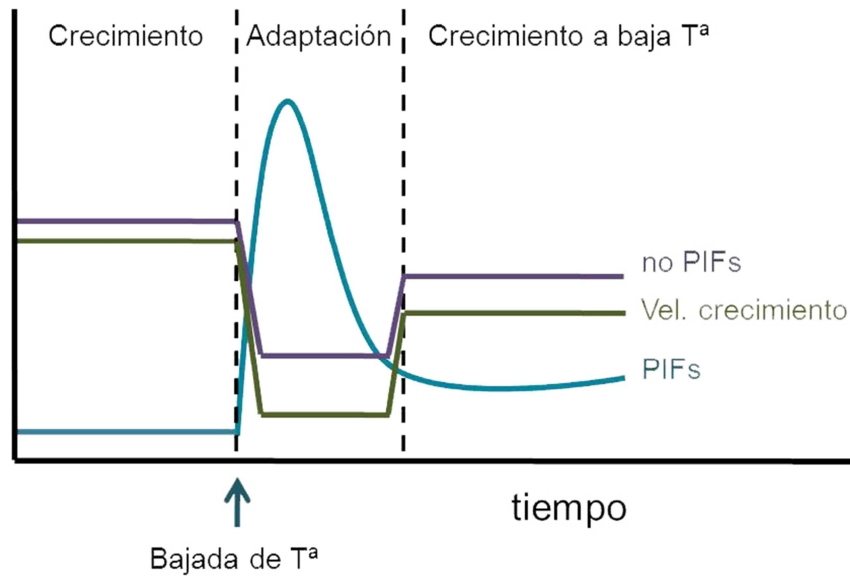


Figura 3. Efecto de una bajada brusca de temperatura en el crecimiento celular y en la síntesis proteica en *E. coli* (adaptado de Inouye 2004 (73)). PIFs: Proteínas que se inducen a baja temperatura. Vel: velocidad.

La respuesta ante la bajada de temperatura en los microorganismos mesófilos tiene como fin principal hacer frente a los problemas derivados de este estrés (Figura 4). Brevemente, uno de ellos es la disminución en la fluidez de las membranas, que puede afectar a procesos biológicos de la membrana tan importantes como el transporte de moléculas, secreción o reacciones enzimáticas (73, 117, 138). Las estrategias utilizadas por las bacterias para contrarrestar esta disminución pueden ser diferentes según la especie, y muchas incluyen modificaciones en la composición de los lípidos de membrana, como por ejemplo, un aumento de los niveles de ácidos grasos con menor punto de fusión como son los ácidos grasos insaturados, de cadena corta o de cadena ramificada (30).

Otro problema importante es la estabilización de estructuras secundarias del ADN y ARN que se produce a bajas temperaturas, lo que puede provocar dificultades en la transcripción, degradación de ARN y traducción (73, 117, 138). De hecho, algunas proteínas encargadas de la degradación del ARN como la PNPasa (polinucleótido fosforilasa) o la helicasa CsdA, han demostrado ser esenciales la supervivencia de *E. coli* a baja temperatura (8, 10). En el caso de *P. putida* o *P. syringae*, La RNasa R es esencial en estas condiciones (123, 127).

Las bajas temperaturas también dificultan el plegamiento de proteínas y disminuyen la actividad enzimática. Por ello, enzimas relacionadas con el procesamiento de proteínas como proteasas y peptidil prolil isomerasas aumentan en esta situación de estrés en muchos microorganismos. También se produce acumulación de sustratos compatibles, como glicina betaína o trehalosa, para prevenir la formación de agregados proteicos (73, 117, 137, 138).

A grandes rasgos, las estrategias para mitigar el estrés derivado de las bajas temperaturas suelen ser similares en diversos microorganismos y se han estudiado principalmente en los organismos modelo *B. subtilis* y *E. coli*, en organismos patógenos contaminantes de alimentos, como *Yersinia enterocolitica* o *Listeria monocitogenes*, y en otras bacterias como *Shewanella oneidensis* (14, 17, 19, 23, 160). Por último, es destacable que para resolver los problemas derivados de un descenso de la temperatura, primero se produce una fase de adaptación a las nuevas condiciones que, a continuación, permite la reprogramación de los patrones de expresión para el crecimiento a largo plazo a baja temperatura (17, 19, 114).

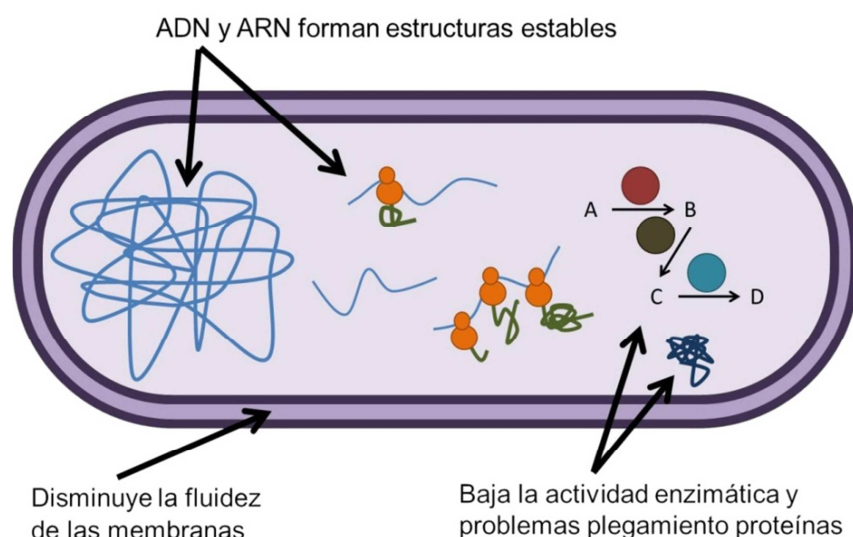


Figura 4. Esquema de los cambios que se producen en las células cuando disminuye la temperatura.

5 OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo inicial de este trabajo era identificar y caracterizar nuevos factores implicados en el fenómeno de represión catabólica en *Pseudomonas putida*. En primer lugar, centramos nuestra atención en un trabajo en el que se describía que la inactivación del gen *rnr*, que codifica para la RNasa R, parecía liberar la represión catabólica en la ruta de degradación de aminoácidos ramificados en *P. putida* (67). Por otro lado, en otro trabajo se describía que la represión catabólica que ejerce el malato sobre la expresión de enzimas implicadas en metabolismo de la glucosa en *P. fluorescens* se libera cuando se crecen las células a bajas temperaturas (89). Basándonos en estas evidencias previas, decidimos:

- Estudiar la posible implicación de la RNasa R de *P. putida* en el fenómeno de represión catabólica, así como estudiar más a fondo el efecto que tiene la inactivación del gen que codifica esta enzima en el fenotipo de la bacteria y en su transcriptoma, analizando su importancia en la estabilidad de los ARN mensajeros.
- Caracterizar el efecto del crecimiento a bajas temperaturas sobre el fenómeno de represión catabólica en medio rico, así como estudiar de forma global las modificaciones que suceden en el proteoma y el transcriptoma de *P. putida* cuando la bacteria se adapta a crecer a bajas temperaturas en este medio.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cepas y plásmidos

Las cepas y plásmidos utilizados en este trabajo se enumeran en la tabla 1. Aquellas estirpes que se obtuvieron a lo largo de este trabajo se describen más detalladamente en el apartado 6.4.2.

Tabla 1. Cepas y plásmidos.

Cepa o plásmido	Descripción	Referencia o fuente
Cepas		
<i>E. coli</i>		
HB101	Hospedador de pRK2013	(134)
CC118 λ -pir	Hospedador de pKNG101	(66)
DH5 α F'	Hospedador para manipulaciones de DNA y transformaciones	(63)
<i>P. putida</i>		
KT2440	Cepa silvestre	(12)
KT2442	Cepa resistente a rifampicina derivada de KT2440	(55)
KTRNR1	Tc ^r , KT2440 Δ rrn::tet	Este trabajo
KTCRC	Tc ^r , KT2440 <i>crc</i> ::tet	Este trabajo
KTCRCZ	Tc ^r , KT2440 Δ crcZ::tet	Este trabajo
MPO401	Rf ^r , Km ^r , KT2442 con Δ cbrB::Km	I. Canosa
PBS4	Rf ^r , Km ^r , KT2442 con fusión <i>PalkB</i> ::LacZ y <i>alkS</i> en el cromosoma	(165)
PBS4R1	Rf ^r , Km ^r , Tc ^r , PBS4 Δ rrn::tet	R. Moreno
PBS4C1	Rf ^r , Km ^r , Tc ^r , PBS4 <i>crc</i> ::tet	(167)
PP2336	Km ^r , KT2440 PP_2336::mini-Tn5Km	(95)
PP2112	Km ^r , KT2440 PP_2112::mini-Tn5Km	(95)
PBA1	Rf ^r , KT2442 con la fusión transcripcional <i>PbenA</i> ::lacZ	(102)
PBA1C	Rf ^r , Tc ^r , KT2442 con la fusión transcripcional <i>PbenA</i> ::lacZ y <i>crc</i> ::tet	(102)

PBA1Z	Rf ^r , Tc ^r , KT2442 con la fusión transcripcional <i>PbenA::lacZ</i> y <i>ΔcrcZ::tet</i>	R. Moreno
Plásmidos		
pGEMT Easy	Ap ^r , vector para clonar fragmentos de ADN	Promega
pKNG101	Sm ^r , <i>SacAB</i> , vector suicida para mutagénesis por intercambio alélico	(78)
pRK2013	Km ^r , ayudante en conjugaciones tripartitas	(52)
pVLT35	Sm ^r , vector de expresión con promotor <i>Ptac</i>	(34)
pSEVA424	Sm ^r , vector de expresión con promotor <i>Ptrc</i>	V. de Lorenzo
pRNR-G	Ap ^r , pGEMT Easy con <i>rnr</i>	(53)
pRNR-GT	Ap ^r , Tc ^r , pGEMT Easy con <i>Δrnr::tet</i>	(53)
pRNR3	Sm ^r , Tc ^r , pKNG101 con <i>Δrnr::tet</i>	(53)
pRNR1	Ap ^r , pGEMT Easy con <i>rnr</i> -PP_4879	Este trabajo
pRNR1	Sm ^r , pVLT35 con <i>rnr</i> -PP_4879	Este trabajo
pCRC10	Sm ^r , Tc ^r , pKNG101 con <i>crc::tet</i>	(167)
pKNGΔcrcZTc	Sm ^r , Tc ^r , pKNG101 con <i>ΔcrcZ::tet</i>	R. Moreno
pCRCZ	Sm ^r , pSEVA424 con <i>crcZ</i>	Este trabajo

6.2 Medios y condiciones de cultivo

Las células se cultivaron en medio rico LB o en medio mínimo de sales M9 (134) suplementado con elementos traza (13) y diferentes fuentes de carbono, según el caso: citrato 30 mM, succinato 30 mM, acetato 30 mM o propionato 50 mM. Para los medios sólidos se añadió agar (15 g/l).

Las temperaturas de cultivo fueron 37°C en el caso de *E. coli* y 30°C, 25°C, 20°C ó 10°C en el caso de *P. putida*.

Los antibióticos utilizados en los diferentes experimentos fueron: ampicilina (100 μg/ml), estreptomicina (50 μg/ml), kanamicina (50 μg/ml), rifampicina (100 μg/ml), tetraciclina (8 μg/ml).

6.3 Técnicas de ADN

6.3.1 Extracción y purificación de ADN

Para la extracción del ADN genómico se utilizó el kit comercial G NOME® de MP Biomedicals siguiendo las instrucciones del fabricante.

La purificación de ADN plasmídico se realizó con el QIAprep® Spin Miniprep kit de QIAGEN siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la purificación de fragmentos de ADN se utilizaron: Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel band purification kit (GE Healthcare) y QIAEX II (QIAGEN) para fragmentos mayores de 10 Kb.

6.3.2 PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

Para amplificar fragmentos de DNA se utilizó el sistema *Expand Long Template PCR de Roche* siguiendo las indicaciones del fabricante. De forma genérica, la PCR se realizó utilizando el siguiente protocolo: 94°C durante 2 minutos para la desnaturalización inicial, 25 ciclos de amplificación (desnaturalización, 94°C 10 s; hibridación, 30 s a la temperatura adecuada según las parejas de cebadores utilizados; elongación, 68°C, 1 min por cada kilobase amplificada), seguido de una elongación final (7 min a 68°C).

6.4 Manipulaciones genéticas

6.4.1 Transformación de ADN

La obtención de células competentes se basó en el protocolo descrito en *Molecular cloning: a laboratory manual* (134). Para preparar bacterias electrocompetentes, se recogieron por centrifugación células creciendo exponencialmente ($OD \cong 0,5$) en medio LB, se lavaron 2 veces con medio volumen de agua MQ a 4°C, y una tercera vez con un cuarto del volumen

inicial de agua MQ a 4°C. Finalmente, las células se lavaron por última vez con 1/20 del volumen inicial de glicerol 10% en agua MQ a 4°C y se resuspendieron en 1/400 del volumen inicial de la solución anterior a 4°C. Se prepararon alícuotas de 100 µl y se almacenaron a -70°C hasta el momento de su uso.

6.4.2 Obtención de estirpes mutantes

6.4.2.1 Inactivación del gen *rnr* en *P. putida* KT2440 y PBS4

La inactivación del gen *rnr* en las cepas de *P. putida* KT2440 y PBS4 se realizó por recombinación homóloga (78) con el plásmido pRNR3, obteniendo las cepas KTRNR1 y PBS4R1, respectivamente. Para obtener el plásmido pRNR3, se amplificó el gen *rnr* de *P. putida* KT2440 mediante PCR utilizando los oligonucleótidos *rnr1* y *rnr2*. El producto obtenido se clonó en el plásmido pGEM-T easy, obteniendo pRNR-G. Este plásmido se digirió con *Sma*I, que corta en dos sitios del centro de *rnr*. El fragmento *Sma*I se substituyó por un fragmento de ADN que codifica para una proteína que confiere resistencia a tetraciclina (35), también digerido con *Sma*I. El plásmido obtenido, que lleva el alelo $\Delta rnr::tet$, se denominó pRNR-GT. El fragmento conteniendo $\Delta rnr::tet$ se escindió de pRNR-GT digiriendo con *Not*I y se clonó en el sitio *Not*I del plásmido pKNG101, un vector diseñado para realizar procesos de mutagénesis por intercambio alélico (78). El plásmido obtenido, que se denominó pRNR-3, se transfirió a *P. putida* KT2440 y PBS4 por conjugación tripartita, utilizando pRK2013 como donador de funciones de transferencia. Se comprobó la ausencia del alelo *rnr* silvestre y la presencia del alelo $\Delta rnr::tet$ por PCR en diferentes aislados de cada cepa, de los cuales se seleccionaron KTRNR1 y PBS4R1 para el trabajo posterior.

6.4.2.2 Complementación de la mutación $\Delta rnr::tet$ en *P. putida* KTRNR1

La mutación $\Delta rnr::tet$ presente en la cepa KTRNR1 se complementó con el plásmido pRNR1, que lleva un gen *rnr* silvestre clonado en el vector pVLT35. Para obtener pRNR1, primero se amplificó por PCR un fragmento de ADN que incluye los genes *rnr* y PP_4879 (localizado inmediatamente después de *rnr*), utilizando ADN genómico de *P. putida* KT2440 como molde

y los oligonucleótidos *rnr-c1* y *rnr-c2* como cebadores. Estos oligonucleótidos contienen dianas para las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III, respectivamente, y permiten amplificar un fragmento que abarca desde el nucleótido -24 antes del codón de inicio del gen *rnr* hasta la posición localizada 16 nucleótidos después del codón *stop* del gen PP_4879. Este fragmento se clonó en el plásmido pGEMT Easy, obteniendo pRNR-C1. El fragmento de ADN clonado en este plásmido se secuenció para comprobar la ausencia de mutaciones. A continuación, se digirió pRNR-C1 con *Bam*HI y *Hind*III y el fragmento conteniendo el gen *rnr* se clonó entre los sitios *Bam*HI y *Hind*III del vector pVLT35, obteniendo pRNR1. Finalmente, pRNR1 se introdujo en la cepa de *P. putida* KTRNR1 por electroporación.

6.4.2.3 Inactivación del gen *crc* de *P. putida* KT2440

La inactivación del gen *crc* de *P. putida* KT2440 se realizó por recombinación homóloga utilizando como donador el plásmido pCRC10, que contiene un alelo *crc::tet* (167). Éste plásmido se transfirió a *P. putida* KT2440 por conjugación tripartita siguiendo protocolos descritos (36), utilizando la cepa pRK2013 como donador de funciones de transferencia. La ausencia del gen *crc* silvestre y la presencia del alelo *crc::tet* se comprobó por PCR en diferentes aislados y se seleccionó la cepa KTCRC para su uso posterior.

6.4.2.4 Inactivación del ARN pequeño CrcZ en las cepas de *P. putida* KT2440 y PBA1.

La inactivación del gen *crcZ* en las cepas de *P. putida* KT2440 y PBA1 se realizó por recombinación homóloga (78) con el plásmido pKNG Δ *crcZ*Tc obteniendo las cepas KTCRCZ y PBA1Z, respectivamente. Para obtener el plásmido pKNG Δ *crcZ*Tc, se amplificaron dos fragmentos de ADN de *P. putida* KT2440 por PCR. Uno de ellos abarca desde el nucleótido -300 (respecto al codón *stop* del gen *cbrB*) hasta el +177. Se utilizaron los oligonucleótidos *crcZ-dir* y *crcZ-Sma-rev* (que contiene una diana para *Sma*I). El otro fragmento abarca desde el nucleótido -105 (respecto al codón de inicio de la traducción del gen *pcnB*) hasta el +401. Se utilizaron los oligonucleótidos *crcZ-Sma-dir* (que contiene una diana para *Sma*I) y *crcZ-rev*. Los productos obtenidos de las PCRs se digirieron con *Xma*I, se ligaron

y, el fragmento de 1 Kb obtenido de la ligación se clonó en el plásmido pGEM-T easy, obteniendo pGEMT Δ crcZ. Este plásmido se digirió con *Sma*I, que corta en el centro de la zona clonada. El fragmento *Sma*I se sustituyó por un fragmento de ADN que codifica para una proteína que confiere resistencia a tetraciclina (35), también digerido con *Sma*I. El plásmido obtenido, que lleva el alelo Δ crcZ::tet, se denominó pGEMT Δ crcZTc. El fragmento conteniendo Δ crcZ::tet se escindió de pGEMT Δ crcZTc digiriendo con *Not*I y se clonó en el sitio *Not*I del plásmido pKNG101, un vector diseñado para realizar procesos de mutagénesis por intercambio alélico (78). El plásmido obtenido, que se denominó pKNGDcrcZTc, se transfirió a *P. putida* KT2440 y PBA1 por conjugación tripartita, utilizando pRK2013 como donador de funciones de transferencia. Se comprobó la ausencia del alelo *crcZ* silvestre y la presencia del alelo Δ rcrcZ::tet por PCR en diferentes aislados de cada cepa, de los cuales se seleccionaron KTCRCZ y PBA1Z para el trabajo posterior.

6.4.2.5 Construcción del plásmido pCRCZ

Para sobreexpresar el ARN pequeño CrcZ, se amplificó un fragmento de ADN que incluye *crcZ* y se introdujo en el vector de expresión pSEVA424 (V. de Lorenzo). Para ello, se amplificó por PCR parte de la región intergénica donde se localiza CrcZ, entre *cbrB* (PP_4696) y *pcnB* (PP_4697). Los oligonucleótidos utilizados fueron *Eco*RI-*crcZ*-Fw2 y *Bam*HI-*crcZ*-Rv2. El fragmento obtenido se clonó entre los sitios *Eco*RI y *Bam*HI de pSEVA424, obteniendo el plásmido pCRCZ. Este plásmido se introdujo en la cepa PBA1 mediante electroporación. Para inducir la expresión de CrcZ, se añadió IPTG 1 mM (concentración final) al medio de cultivo.

6.4.3 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados para reacciones de PCR se indican en la Tabla 2.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para PCR.

Nombre	Secuencia 5'→ 3'	Descripción
<i>mr_1</i>	GGGTTGTCCGTCGTTGTGGT	Construcción mutantes KTRNR1 y PBS4R1
<i>mr_2</i>	GCCGTAGATTTTTTCCAGCTG	Construcción mutantes KTRNR1 y PBS4R1
<i>mr-c1</i>	GGATCCATACCCCAAGGTGAACC	Complementación de KTRNR1
<i>mr-c2</i>	AAGCTTCGGAACAGGCTGAGAGTC	Complementación de KTRNR1
<i>crcZ dir</i>	ATCCTCAGCGAGAGCGCAGAA	Construcción mutantes KTCRCZ y PBA1Z
<i>crcZ Sma rev</i>	CGTACGCCCCGGGGACTGTTACG	Construcción mutantes KTCRCZ y PBA1Z
<i>crcZ Sma dir</i>	CCTGCTACCCGGGTACACCATTC	Construcción mutantes KTCRCZ y PBA1Z
<i>crcZ rev</i>	ATGCGACGAACGGTGGGCATC	Construcción mutantes KTCRCZ y PBA1Z
<i>EcoRI-crcZ-Fw2</i>	AAGAATTCTATATGTTTGGTACAAG AACAATAACAAGC	Sobreexpresión de CrcZ
<i>BamHI-crcZ-Rv2</i>	AAGGATCCGGGTAGCAGGATGCCT GCCAGAAGGGTA	Sobreexpresión de CrcZ

6.5 Técnicas de ARN

6.5.1 Extracción y purificación de ARN

El ARN se extrajo utilizando dos métodos diferentes, según se indica más adelante. La integridad del ARN se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. En el caso del ARN destinado a ensayos con *microarrays*, la integridad se analizó también por electroforesis capilar (Agilent 2100 Bioanalyzer). La concentración se midió por espectrofotometría ultravioleta utilizando un espectrofotómetro Nanodrop™ 1000.

6.5.1.1 Extracción de ARN con TRIZOL

Para la extracción de ARN por este método se utilizó TRI REAGENT® LS de Molecular Research Center siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.5.1.2 Extracción de ARN con columnas RNeasy de QIAGEN

En este caso, el ARN se extrajo con el sistema RNeasy Mini Kit (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. Además, durante la extracción se realizó un tratamiento con DNasa I (RNase-free DNase Set de QIAGEN).

6.5.1.3 Tratamiento del ARN con DNasa I

Aquellas muestras de ARN destinadas a ensayos de RT-PCR en tiempo real se sometieron a un tratamiento con DNasa I (Turbo DNA-free™ de Ambion), siguiendo las instrucciones del fabricante para tratamientos intensivos.

6.5.2 Análisis del transcriptoma mediante *microarrays* genómicos

Los ensayos de transcriptómica se realizaron con el *microarray* de *P. putida* desarrollado en nuestro grupo (166) y comercializado por la empresa Progenika. Este *microarray* contiene oligonucleótidos de 50 bases, por duplicado, que hibridan con los 5350 ORFs anotados en el genoma de *P. putida* KT2440. El *microarray* se utilizó para comparar los niveles de los ARNm celulares de dos muestras, una considerada como control y la otra como problema. El marcaje, hibridación, y procesamiento estadístico de los datos se realizó en la unidad de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología siguiendo los protocolos descritos en Yuste et al., 2006 (166). De forma muy resumida, 20 µg de ARN de cada muestra a comparar se transformaron en ADNc. A continuación, el ADNc de una de las muestras se marcó con el compuesto fluorescente Cy3, y la otra con el compuesto Cy5, utilizando el sistema SuperScript Indirect ADNc Labeling System (Invitrogen). Las dos muestras de ADNc marcadas se mezclaron y se hibridaron al *microarray*.

Después de la hibridación, los *microarrays* se escanearon a las longitudes de onda correspondientes para la excitación de los fluoróforos Cy3 y Cy5. Los resultados obtenidos se normalizaron y analizaron estadísticamente con el programa informático LIMMA. Los valores de probabilidad *P* obtenidos se corrigieron mediante el procedimiento False Discovery Rate (FDR) para disminuir los falsos positivos (15).

6.5.3 RT-PCR en tiempo real

6.5.3.1 Síntesis de ADNc

En primer lugar se comprobó la ausencia de ADN genómico contaminante en las muestras de ARN mediante PCR en tiempo real, utilizando cebadores para el gen *rpoN*. A continuación, 10 µg de ARN de cada muestra se retrotranscribieron utilizando el sistema High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit de Applied Biosystems, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las condiciones de reacción fueron 10 min a temperatura ambiente, 2 h a 37°C, y 5 s a 85°C. Las muestras se almacenaron a -70°C para su posterior utilización.

6.5.3.2 PCR en tiempo real

Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron utilizando el DNAc de las muestras a analizar, obtenidas como se ha descrito anteriormente y en diluciones seriadas, junto con *Power SYBR® Green PCR Master Mix* de Applied Biosystems y los oligonucleótidos utilizados como cebadores a una concentración de 0,2 µM. Las condiciones de reacción fueron las mismas que las descritas en Morales et al., 2006 (98). De forma resumida, se realizó un primer paso de desnaturalización a 95°C durante 10 min, y 40 ciclos de amplificación (95°C 15 s, 60°C 1 min), midiendo la fluorescencia emitida al final de cada uno de estos 40 ciclos. Finalmente, para asegurar que se había amplificado un único fragmento de ADN, se realizó un gradiente de temperatura, comprobando que los cebadores daban la señal de fluorescencia a una única temperatura, correspondiente a un único proceso de hibridación. Los datos obtenidos se analizaron mediante los métodos del $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ó $2^{-\Delta C_t}$ (éste último sólo se utilizó en los casos en los que

se comparaba ARNm del mutante en la RNasa R con la cepa silvestre, ya que no se encontró ningún control interno válido para esta situación). Ambos métodos no dan resultados de expresión absolutos, sino que permiten comparar dos situaciones (87). Excepto en los casos indicados, los datos se normalizaron respecto a *rpoN* como control interno, ya que la expresión de este gen se mantiene constante a lo largo de las diferentes fases de crecimiento (74, 75, 166). Salvo que se indique lo contrario, los valores finales proporcionados son las Medias Aritméticas de los resultados obtenidos en al menos tres réplicas biológicas, y el error se expresa en forma de Error Estándar de la Media. En el caso de los gráficos de columnas, sólo se representa la barra de error superior.

6.5.3.3 Oligonucleótidos utilizados en reacciones de PCR en tiempo real

El diseño de los oligonucleótidos se hizo utilizando el programa Primer Express 3.0 (AB Applied Biosystems) utilizando los parámetros predeterminados. A continuación se muestra la Tabla 3 con las parejas de oligonucleótidos que se utilizaron para cada gen en este trabajo.

Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para RT-PCR en tiempo real.

ID Gen	Gen	Cebador directo Secuencia 5'-> 3'	Cebador inverso Secuencia 5'-> 3'
PP_0137	<i>gltP</i>	TCAAGGTCACCCACATGATCA	CACGGTCACCGCAATCAG
PP_0217		CATCGGCGGTGAAGAACTG	CAGCGTTTGACCGAGAGCTT
PP_0387	<i>rpoD</i>	CGCCCTGGGTGAAAAGAAC	TTCGGTCTCAAGGTCGATCAG
PP_0519	<i>thiL</i>	TGCATCGAGGTACATATCATTGG	TTATGTCCTGGCCCTGTGAGT
PP_0584		GGCAGCCGAAGAACAGCAT	GCGCATCCCCGTGAATC
PP_0626	<i>ndh</i>	GGCGCGCATGTTCTATGTG	TGCGGAAGAACCCGTACAG
PP_0838		GGCAAAGATTACCTGTGGATCAT	GGGATACCGCGCAGGAA
PP_0882		CGTGCGTAAAGCCATCAACA	GCCTTTGCCAAACAGTTGGT
PP_0883		GAGCACCGGCCTGAACTACT	TGTCGATCTTGCCCATTTTCT
PP_0952	<i>rpoN</i>	TCGACCCGGAGCTGGATA	CGGCTCGAACTGCTGGAT
PP_1085	<i>rnt</i>	GTCGTGGTGGATGTTGAAACC	GGTGACGGCGGCAATTT
PP_1185		TGTGCGTCTGGGCAAGATC	TGGTCGCCAGAGACGTTGT
PP_1295	<i>rhlB</i>	CGGGCGTGGGATCCATA	GTCTTCCGGCAGGGTGAAG
PP_1664	<i>purN</i>	AGCGGGTACACCATCAGGAA	ACGCAAGCGCCCTTCA
PP_1785	<i>rmlB</i>	AATCCCATGTAGACCGCTCAA	CCCATCACGTTGGTTTCGA
PP_1905	<i>rne</i>	CATCCGTGACGTGCAATCG	TCGAGTTACGCTTTTCGTTTCAG
PP_2088	<i>sigX</i>	TCATGCGGCGCTACCAA	TCACGGTCGTTCCCCAGATA
PP_2112	<i>acnA</i>	CGGCGCGCATATCCA	TCTGTTCTGTTGGCCATCTT

PP_2136	<i>fadB</i>	CAGTCGGCGGTCAAAGGTA	CAACTTGGAGGCCTCGTTCA
PP_2333		GTTCTCTGCCACGCCTAACC	GGCATCAAGAATGCGATGGT
PP_2334	<i>prpB</i>	AATGGTCGACCGTATCAAAGCT	CGCGCCATGATCACGAA
PP_2335	<i>prpC</i>	CCCCAACGCCGACTTCTAC	GTGAACAGCTTGGTCGGAATG
PP_2336		AGCTGGCCCCGAACATC	TAAGCGCCGACCACTTTCTG
PP_2337		TGTTCCGCGCAACGGTAT	CGATGATGGTCTTGCCGATAT
PP_2338	<i>prpD</i>	TGCGTAACCGTCTGCATGAA	TGCGGATCGCTGATTCT
PP_2471	<i>ihfA</i>	AAGAGAACGAGCAGGTCAAGCT	GCCGCTGGCGTTTGTCT
PP_3372	<i>cpxR</i>	GTTGTCCGGCCATTTCCA	GCACCTCGATACCGGAGATG
PP_3409	<i>cobE</i>	CGCAACTGCAACCCTATGAA	CACTGTGCCGGTGAGCAA
PP_3508	<i>cobW</i>	CATGACCACGACGCTTTTCG	CAACTGGGTCAATGCATCGA
PP_3754		CGGGTAGCGGCAATGAAC	AGGCGGTTGACGTTGAATG
PP_3755	<i>paaH</i>	GGCCGCCAGCATCGA	TCATCGGTACCGGGTTGAA
PP_4066	<i>liuC</i>	TTCAGCACCTCTGAAGTGATC	TTGTTCTTGTCTCACGGCTTA
PP_4250	<i>ccoN-1</i>	GGCTGGGTAGCGATGATCTC	ATGCGTTCTTTGCCGAACAC
PP_4264	<i>hemN</i>	GACCCTAAACAACGTGTTGAACAG	TCCACATGGCTGAGGAAGGT
PP_4265	<i>anr</i>	CGGCTATTCGGCCAATCA	CAAGGTAATTGCCGATTTCTG
PP_4341	<i>fliA</i>	CCATGCGTGCGGTTGAA	TGGAGTTCGGCAGCAACTT
PP_4370	<i>fliE</i>	GCGGCGTCGACCTGACT	TCGACACGCTGGCCTTTT
PP_4371	<i>fleR</i>	TGGGCGATACCCTGGAAAT	GGGCATGTTGACGTCACTGA
PP_4373	<i>fleQ</i>	AAGTGCTGTGCGTGCTCATC	GCAGCCCAAGCAGATTGC
PP_4378	<i>fliC</i>	TGCAGTCGATCTCGGAAACT	AAGTCGGCATCTGGATACG
PP_4395	<i>fglM</i>	CAGCGGAGAGGCGGTACA	TCGTCGCGCAGCTTGTC
PP_4401	<i>bkdA1</i>	CGCGCCCCGGTCAT	GCCTGGAAGGTGGAATGG
PP_4402	<i>bkdA2</i>	CCCGGAAGCGATGTTTAC	AGGCAATCAACAGGCCCTTTG
PP_4532	<i>srmB</i>	CCCTGCGCGACATCATC	TCAGCCAGTTGCGAGACACT
PP_4591	<i>rnd</i>	TGGCCGCCGGTTACC	CAATTCGATGCCAGCACTT
PP_4607		CCGTTTACCGCCGATCAC	GTTGATCCGGTTGAACCATTG
PP_4608		CGCACCCGGCAGATCTT	CTTTGGCGATCTCGCTGTACT
	<i>crcZ</i>	ACAACCAGGCAGAGAACAACAA	CACGTTGATCTGTGATCCAA
PP_4708	<i>pnp</i>	CACCGTTTCGCGAAAACATC	GGGCGTACGGTCTTGTGTCT
PP_4726	<i>dnaJ</i>	GCCGTTTGGCGATGAAGTAC	TTGAACTTGCTTCCGATTCTTTA TC
PP_4730	<i>fur</i>	GAAAATAGCGAATTGCGCAAA	CGAGCATCTGAAGGATCTTGACT
PP_4880	<i>rnr</i>	TGGCAGCAAATCGGAGAAA	GGCCTTTACGGTGCTTGGT
PP_4980	<i>rhIE</i>	CCAGTTGCCCATGTTGTC	ATAGCTTCGCCCGAACGA
PP_5264		GGGTGCGCCACAAGGTT	GTAGTCGATGTGCGGATCA
PP_5292	<i>crc</i>	CCGACGTCATCTGCCTTCAG	GAAAGCTGGGTGCTCGAGTTC
PP_5294	<i>rph</i>	AAGGCGCACCGTTCCA	GCCCTTCTGCGCCAAAG

6.6 Análisis de proteínas

6.6.1 2D-DIGE

6.6.1.1 Preparación de las muestras

Se cultivaron ocho muestras independientes de *P. putida* KT2440 en 60 ml de LB, cuatro a 30°C y otras cuatro a 10°C, en matraces aireados por agitación. Cuando los cultivos llegaron a la mitad de su fase exponencial ($A_{600} = 0,6$), las células se recogieron por centrifugación a 4°C. Las células se rompieron por sonicación en hielo (5 pulsos de 30 s) en 10 ml de 20 mM Tris-HCl, 7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, en presencia de inhibidores de proteasas (Protease inhibitor cocktail tablets de Roche). A continuación, las muestras se centrifugaron 45 min a 12.000 rpm, a 4°C. Los sobrenadantes se almacenaron a -70°C.

6.6.1.2 Marcaje, electroforesis 2D, visualización, análisis de imágenes e identificación de las proteínas

El marcaje, electroforesis 2D, visualización, análisis de imágenes e identificación de proteínas fue realizado por la unidad de Proteómica de Centro Nacional de Biotecnología, siguiendo protocolos descritos en (54).

Los ensayos se realizaron siguiendo la técnica DIGE (*Difference gel electrophoresis*), que permite comparar dos proteomas dentro de un solo gel 2D. De forma muy resumida, 50 µg de cada una de las dos muestras biológicas a comparar se marcaron con el reactivo fluorescente Cy3 (emite luz de color verde), o con el reactivo Cy5 (emite luz de color rojo). Además, como control interno, también se marcó una mezcla de los dos proteomas comparados con el reactivo Cy2 (emite luz de color azul). A continuación, se mezclaron 50 µg de la muestra marcada con Cy3, 50 µg de la muestra marcada con Cy5, y 50 µg del estándar marcado con Cy2. En la primera dimensión, las proteínas se separaron en función de su punto isoelectrico mediante isoelectroenfoque. Posteriormente, las proteínas se resolvieron en una segunda dimensión, en función de su masa molecular, mediante electroforesis en presencia de SDS. Se realizaron cuatro análisis de este

tipo, correspondientes a cuatro parejas de muestras. Los geles bidimensionales se visualizaron mediante fluorescencia a las longitudes de onda correspondientes al Cy3, Cy5 y Cy2. Las imágenes obtenidas se analizaron con el programa informático DeCyder v7.0 de GE Healthcare para obtener los ratios de intensidad de cada punto (Cy3 y Cy5 con respecto al estándar Cy2). Los valores obtenidos se sometieron a análisis estadísticos para calcular los *ratios* medios y reducir los falsos positivos mediante el procedimiento “False Discovery Rate” (16)

Tras visualizar los geles por fluorescencia, se tiñeron con plata para detectar las proteínas. Aquellos puntos que mostraron una expresión diferencial en las dos muestras analizadas se recortaron del gel para identificar las proteínas que contenían. Esto se realizó digiriendo las proteínas con tripsina y analizando la huella peptídica generada mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Las masas de los péptidos obtenidas se compararon con los predichos para cada proteína de la base de datos no redundante del NCBI. En aquellos casos en los que se observó que el punto analizado contenía más de una proteína, dando lugar a identificaciones ambiguas, los péptidos se identificaron además por secuenciación MS/MS.

6.6.2 Western blotting

Los ensayos por *Western blot* se realizaron siguiendo protocolos establecidos (134). Las condiciones específicas se describen a continuación.

6.6.2.1 Obtención y purificación de extractos celulares

Para cada cepa y condición, se centrifugaron 8 ml de cultivo (D.O. = 0,6) durante 5 min a 9000 rpm a 4°C, y se resuspendieron en 300 µl de Tris-HCl 50 mM, pH 8. Las células se rompieron por ultrasonidos (2 pulsos de 30 s y uno de 15 s). A continuación, las muestras se centrifugaron 20 min a 4°C a 13,500 rpm en una minifuga y se recogió el sobrenadante. La concentración de proteínas se cuantificó por el método del ácido bicinconínico (BCA Protein assay Reagent Kit, Pierce).

6.6.2.2 Electroforesis, transferencia e hibridación

Las proteínas se resolvieron en un gel de poliacrilamida con SDS (12,5% de acrilamida, 29:1 acrilamida/bisacrilamida), de 8,3 x 7,3 cm y 1 mm de espesor, cargando 5 µg de cada extracto de proteínas. La electroforesis se realizó a 120 V durante 80 min. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Immobilon-P Transfer membrane Millipore) mediante electrotransferencia, manteniendo un voltaje de 100 V durante 70 min en tampón de transferencia (40 mM glicina, 50 mM Tris-Base, 1,3 mM SDS, 20 % (v/v) metanol). La membrana se bloqueó durante 16 h en tampón de bloqueo (leche en polvo 3 % en TBS-T (20 mM Tris-Base, 150 mM NaCl, pH 7,5, 0,1 % (v/v) Tween-20). A continuación, la membrana se incubó con un anticuerpo de conejo anti-Crc (133) (dilución 1:3000) en tampón TBS-T. Para visualizar el anticuerpo unido a Crc, se utilizó un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a HRP (*Horseradish Peroxidase*) (BioRad) (dilución 1:5000) en TBS-T y el kit de detección ECL plus *Western blotting* (GE Healthcare).

6.7 Ensayos de actividad β -galactosidasa

La actividad de los promotores *PalkB* y *PbenA* se analizó midiendo la actividad del enzima β -galactosidasa a lo largo del crecimiento en cepas que llevan fusiones transcripcionales de *PalkB* ó *PbenA* con el gen *lacZ*, respectivamente. El protocolo utilizado fue el descrito por Miller (93). Las cepas analizadas se crecieron en medio de cultivo indicado en cada caso hasta fase estacionaria y, posteriormente, se diluyeron en medio fresco hasta una densidad óptica (A_{600}) de 0,05. Los cultivos se incubaron con agitación a la temperatura correspondiente y, a distintos tiempos, se tomaron muestras para medir la actividad β -galactosidasa. Para inducir el promotor *PalkB*, se añadió DCPK a una concentración final de 0,05% (vol/vol) (165). Para inducir *PbenA*, se añadió benzoato de sodio hasta una concentración final de 5mM (102). Como sustrato de la β -galactosidasa se utilizó ONPG (o-nitrofenil- β -D-galactopiranósido).

6.8 Recuento de células viables

Para el recuento de unidades formadoras de colonias (CFU), se inocularon matraces de 50 ml de LB y se cultivaron a 30°C y 10°C. A distintos tiempos a lo largo del crecimiento se tomaron muestras de cada cultivo, se realizaron diluciones seriadas 1:10 de las que se sembraron en placas de LB agar 100 µl de cada una. Se incubaron a 30°C 16 h y se contaron aquellas placas que presentaban entre 25-200 colonias para estimar el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) que había en cada momento en los diferentes cultivos.

6.9 Ensayos de *swimming*

Cultivos O/N de cada una de las cepas se igualaron a la misma densidad óptica. Se colocaron 3 µL de cada uno en el centro de placas Petri que contenían 25 mL de triptona (10 g/L), NaCl (5 g/L) y agar 0,3% (125) y se incubaron toda la noche a 25°C (92). Los cambios en la motilidad se analizaron midiendo el desplazamiento de las bacterias desde el centro de la placa hacia la periferia.

6.10 Ensayos de golpe de frío

Para realizar estos ensayos, las células se cultivaron en matraces con medio LB líquido a 30°C con agitación. Al llegar a una densidad óptica A_{600} de 0,6, los matraces se trasladaron a un baño a 10°C con agitación. Tras dos horas de incubación, las células se recogieron por centrifugación a 4°C.

7 RESULTADOS

RESULTADOS

7.1 La RNasa R: su función en represión catabólica y en el procesamiento de los ARNs mensajeros.

En un trabajo anterior dirigido a buscar genes implicados en represión catabólica de la ruta de degradación de aminoácidos ramificados de *P. putida*, se encontró que la inactivación del gen *rnr*, que codifica para la RNasa R, parecía liberar dicha represión (67). Sin embargo, no se profundizó en esta observación. Para indagar hasta qué punto este enzima es importante para el proceso de represión catabólica, analizamos su influencia en la represión catabólica de la ruta de degradación de alcanos del plásmido OCT de *P. putida*, el principal sistema modelo de nuestro grupo. En paralelo, y para ver la influencia de este enzima sobre la expresión de otras rutas catabólicas, analizamos el efecto de inactivar la RNasa R en el transcriptoma de la célula en condiciones en las que la represión catabólica es muy elevada. Dada la limitada información que había sobre esta ribonucleasa, este análisis nos sirvió también para profundizar en su función en la fisiología de la célula. Los escasos datos disponibles indicaban que la RNasa R está implicada en el procesamiento de ARNs con una elevada estructura secundaria, como ARNs ribosomales o de transferencia, pero su actividad sobre ARNs mensajeros no se había analizado en profundidad. Por lo tanto, tratamos de caracterizar la influencia de esta RNasa en el transcriptoma celular. Finalmente, también se había observado que la RNasa R es esencial para que la célula crezca a 4°C, pero no a 30°C (127), por lo que tratamos de combinar todas estas observaciones. Los resultados se describen a continuación.

7.1.1 Efecto de la ausencia de la RNasa R sobre la represión catabólica ejercida sobre la ruta de degradación de alcanos

Para analizar si la RNasa R tiene alguna función en el fenómeno de represión catabólica que afecta a la ruta de degradación de alcanos del plásmido OCT, utilizamos la cepa indicadora *P. putida* PBS4. Esta cepa no contiene el plásmido OCT, sino simplemente una fusión transcripcional del promotor de los genes estructurales de esta ruta, *PalkB*, al gen indicador

lacZ (*PalkB::lacZ*), y el gen regulador *alkS*, que permite la activación del promotor *PalkB* en presencia de alcanos (165). Tanto la fusión *PalkB::lacZ* como el gen *alkS* están insertados en el cromosoma. La inducción de *PalkB* por la proteína reguladora AlkS, en presencia de alcanos, está fuertemente inhibida por represión catabólica cuando las células crecen en medio rico (165). Para analizar el efecto que pudiese tener la RNasa R sobre este fenómeno, inactivamos el gen *rnr* en la cepa PBS4 sustituyéndolo por un derivado *rnr::tet* mediante intercambio alélico. La cepa resultante se denominó PBS4R1.

Las cepas de *P. putida* PBS4 y PBS4R1 se cultivaron en LB a 30°C en presencia del inductor DCPK, un compuesto que emula la acción de los alcanos pero que es más soluble en agua, y se midió la actividad β -galactosidasa derivada de la fusión *PalkB::lacZ* a lo largo del crecimiento. Como se muestra en la (Figura 5), la actividad del promotor *PalkB* en la cepa PBS4 fue muy baja durante toda la fase exponencial de crecimiento a pesar de la presencia del inductor en el medio, y esta inhibición no desapareció hasta que las células empezaron a entrar en fase estacionaria, a densidades ópticas cercanas a 1,5 - 2. Este efecto se debe a un fenómeno de represión catabólica bien caracterizado mediado en parte, aunque no exclusivamente, por las proteínas Crc y Cyo (41, 42, 167). El efecto inhibitorio no disminuyó al inactivar el gen *rnr* (cepa PBS4R1, Figura 5). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la RNasa R no está implicada en la represión catabólica en medio rico que afecta a este promotor. Este resultado, sin embargo, no descarta que la RNasa R no pueda estar implicada en la represión catabólica de otros genes. Para explorar esta posibilidad, decidimos analizar el efecto de la ausencia de la RNasa R en el conjunto del transcriptoma de la célula en condiciones en las que la represión catabólica es máxima, es decir, en células creciendo exponencialmente en medio rico LB.

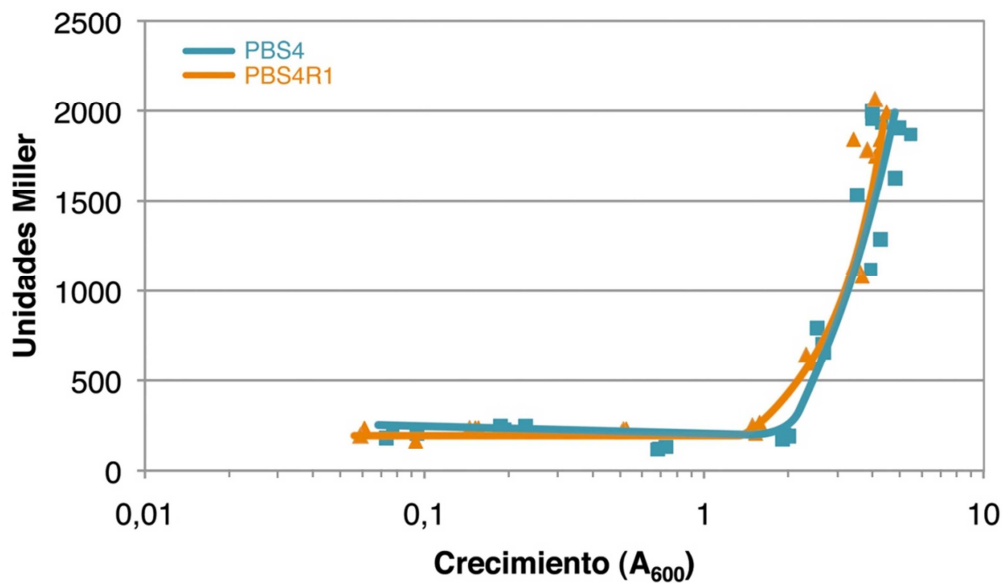


Figura 5. Expresión del gen *lacZ* desde del promotor *PalkB* (expresado en unidades Miller) en función de la densidad celular, en células creciendo en medio LB a 30°C en presencia del inductor DCPK. Se utilizaron las cepas PBS4 (color azul) y PBS4R1 (color naranja; deficiente en el gen *rnr*).

7.1.2 Efecto de la ausencia de la RNasa R sobre el transcriptoma en células creciendo exponencialmente en medio rico a 30°C.

Para analizar la influencia de la RNasa R en el transcriptoma de la célula se inactivó el gen *rnr* en la cepa silvestre *P. putida* KT2440, sustituyéndolo por un derivado *rnr::tet* mediante intercambio alélico. La cepa resultante se denominó KTRNR1. El transcriptoma de *P. putida* KT2440 y KTRNR1 creciendo en medio rico LB a 30°C se comparó utilizando un *microarray* genómico (166) que permite analizar todos los ARNm anotados en el genoma de esta bacteria. Para este experimento se utilizaron 5 *microarrays*, correspondientes a 5 parejas de muestras biológicas independientes. Tras el procesamiento estadístico de todos los datos (que están depositados en la base de datos ArrayExpress con el número de

acceso E-MEXP-1440), seleccionamos aquellos genes cuyos niveles de ARNm en la cepa mutante respecto a la cepa silvestre variaron más de dos veces, con un valor de probabilidad $P < 0,05$ (corregido por FDR). Con este criterio de selección, un total de 199 genes presentaban diferencias significativas en los niveles de ARNm en la cepa mutante respecto a la silvestre. Estos niveles eran mayores en 172 genes, y menores en otros 27 genes. Estos resultados son razonables puesto que estamos inactivando una RNasa, por lo que es de esperar que en su ausencia muchos mRNAs se degraden peor o más despacio. Los genes afectados pertenecían a varias categorías funcionales diferentes (ver Figura 6 y Tabla 12). Entre ellos encontramos algunos genes implicados en el transporte de aminoácidos o en metabolismo de diferentes sustratos, pero no se aprecia un efecto claro en la liberación de la represión catabólica que sabemos que afecta a diversas rutas catabólicas de aminoácidos y azúcares. En particular, no se aprecia liberación de la represión que afecta a los genes de transporte y asimilación de aminoácidos ramificados, en contra de lo que se había descrito (67). Esto puede deberse, al menos en parte, a que el microarray no tenga la sensibilidad suficiente para detectar cambios pequeños en los niveles de ARNm. No obstante, parece claro que la ausencia de la RNasa R no tiene un efecto notorio sobre la represión catabólica que afecta a rutas de asimilación de aminoácidos y azúcares en medio LB.

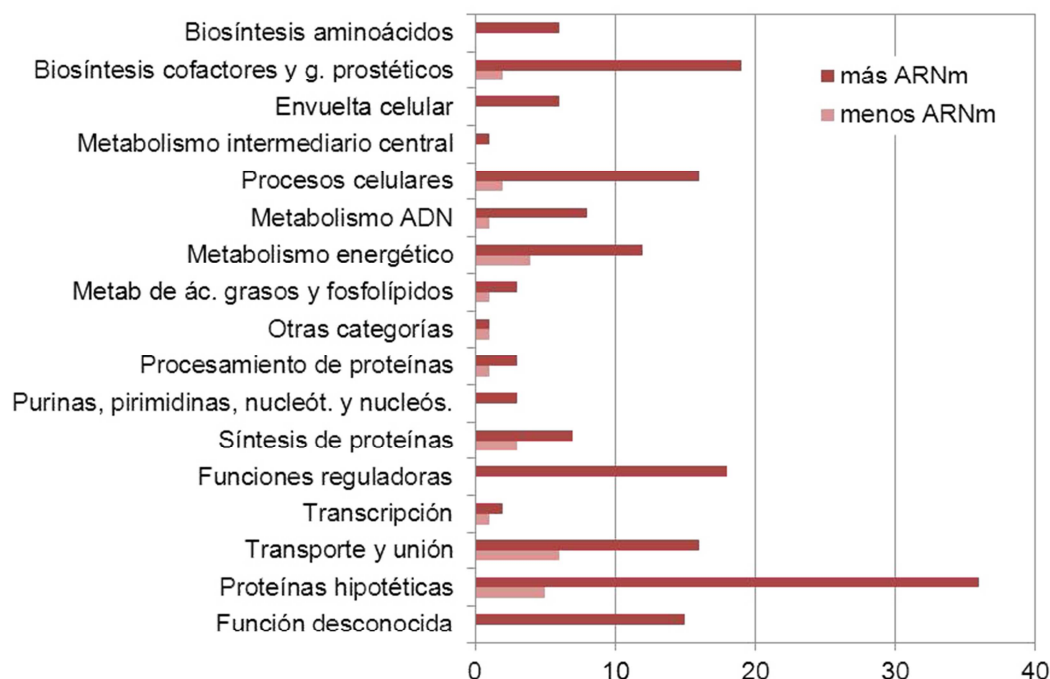


Figura 6. Genes cuyos niveles de mRNA varían en la cepa mutante en *rnr* respecto a la cepa silvestre, agrupados por categorías funcionales. En rojo oscuro, genes cuyo ARNm es más abundante en ausencia de la RNasa R; en rojo claro, genes cuyo ARNm es menos abundante en ausencia de este enzima.

7.1.3 Validación de los resultados de los *microarrays*

El siguiente paso a realizar fue validar los resultados obtenidos con los *microarrays*. Para ello se seleccionaron 16 genes y se compararon los niveles de ARN mensajero de la cepa mutante con respecto a la silvestre por RT-PCR en tiempo real según el método del $2^{-\Delta Ct}$ (87) y utilizando tres muestras biológicas diferentes. Los genes seleccionados incluyen 11 cuyos niveles de mRNA aumentan en la cepa KTRNR1 (*anr*, *cob*, *cpxR*, *fleR*, *fliA*, *fliE*, *ihfA*, PP_4607, PP_4608, *purN* y *thiL*) y 5 cuyos niveles aparentemente no cambian (PP_1185, PP_0838, PP_5264, *nuoM* y *sigX*), según los resultados de los *microarrays*. Tal y como puede observarse en la Figura 7,

los resultados confirmaron que los 11 genes que en los ensayos de *microarrays* parecían tener niveles de ARNm elevados en ausencia de RNasa R también tenían mayor cantidad de ARN según los resultados de RT-PCR en tiempo real.

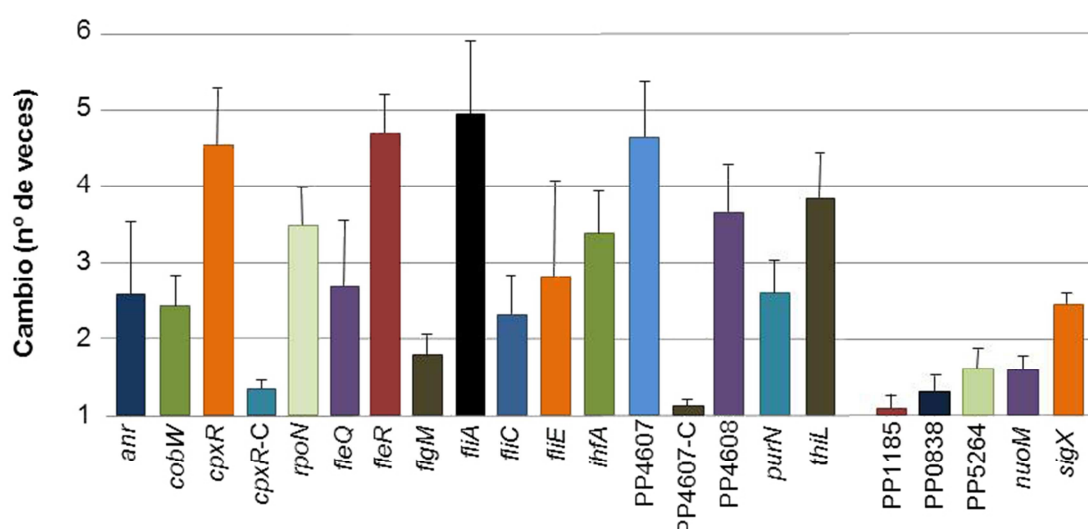


Figura 7. Efecto de la inactivación del gen *rnr* en los niveles de ARNm de los genes indicados, medido por RT-PCR en tiempo real. Los valores indican el cociente entre los niveles de ARNm de la cepa KTRNR1 y los de la cepa KT2440. Se muestra la media de, al menos, tres experimentos independientes y el error estándar.

Para los genes *PP4607* y *cpxR*, también medimos por RT-PCR los niveles de ARNm en la cepa KTRNR1 conteniendo el plásmido pRNR1, en la que la mutación en la copia cromosómica del gen *rnr* está complementada *in trans* por el alelo *rnr* silvestre presente en el plásmido. En ambos casos los niveles de ARN mensajero volvieron a los valores de la cepa silvestre (indicado en la Figura 7 como *PP4607-C* y *cpxR-C*). En el caso de los 5 genes cuyos niveles parecían no cambiar en los *microarrays*, las variaciones detectadas por los ensayos de RT-PCR en tiempo real fueron menores de 1,5 veces en cuatro de los casos (*PP_1185*, *PP_0838*, *PP_5264* y *nuoM*). Esto sugiere que los resultados de los *microarrays* son en su conjunto correctos, aunque quizá hayan subestimado el número real de genes afectados por la ausencia de la RNasa R.

7.1.4 La RNasa R y el sistema flagelar: la cepa KTRNR1 está dotada de mayor motilidad.

Los genes afectados por la ausencia de la RNasa R, según los resultados de los *microarrays*, pertenecen a diferentes clases funcionales (Tabla 12), pero entre ellos hay un número elevado de genes relacionados con el sistema flagelar. La organización de los genes flagelares en *P. putida* KT2440 es muy similar a la de *Pseudomonas aeruginosa* (32). En *P. aeruginosa* el regulón flagelar consiste en cuatro clases de genes cuya expresión está regulada de forma coordinada y jerarquizada por las proteínas reguladoras RpoN, FleQ, FleS, FleR, FliA y FglM (33).

Los *microarrays* y/o los ensayos de RT-PCR en tiempo real, mostraron que los niveles de ARNm de los genes reguladores *rpoN*, *fleQ*, *fleR*, *fliA*, y en menor medida *flgM*, eran mayores en la cepa KTRNR1 que en la cepa silvestre (Figura 7 y Tabla 12). Lo mismo se observó con los genes estructurales *flgF*, *flgJ*, *fliE*, *fliK*, *fliR*, *flhB* y *flhF*, *motB* y *flgA*.

A la vista de estos resultados, el siguiente paso fue investigar en qué medida estos cambios en la expresión de genes flagelares afectaban a la fisiología celular. Para ello, realizamos ensayos de capacidad de *swimming* de las cepas KTRNR1, KT2440 y KTRNR1 complementada con el plásmido pRNR1. Estos ensayos se basan en que, en un medio adecuado, las bacterias con flagelo son capaces de nadar a través de los canales llenos de agua que forma el agar a baja concentración, migrando desde el punto de inoculación. El tamaño del halo de crecimiento de la bacteria desde el punto de inoculación es proporcional a su capacidad natatoria. Tras 16 horas de crecimiento a 25°C, el halo formado por la cepa silvestre KT2440 tenía $2,5 \pm 0,1$ cm, mientras que este valor fue de $3,6 \pm 0,2$ cm en la cepa KTRNR1, lo que supone un 46% de aumento (ver Figura 8). Al complementar la mutación en el gen *rnr* de la cepa KTRNR1 con el plásmido pRNR1, el diámetro del halo revirtió a un valor similar al de la cepa silvestre: $2,4 \pm 0,1$ cm. Es decir, la ausencia de la RNasa R conlleva un aumento de la motilidad.

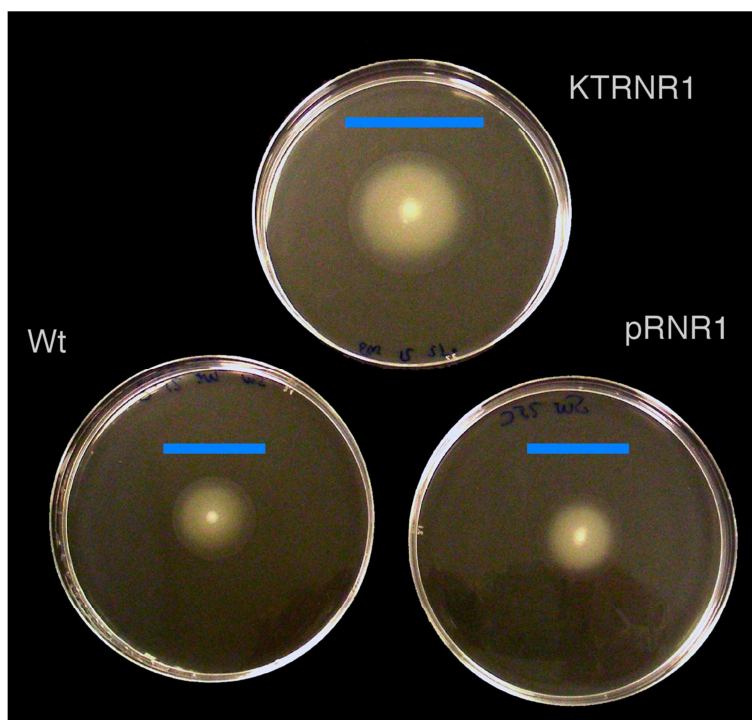


Figura 8. Motilidad de las cepas de *P. putida* KT2440, KTRNR1 (con el alelo *rnr* inactivado) y KTRNR1 con el plásmido pRNR1, que contiene una copia del gen silvestre *rnr*. Las bacterias se inocularon en el centro de una placa con LB+0,3% de agar y los halos de crecimiento se visualizaron tras 16 horas de incubación a 25°C.

7.1.5 La RNasa R afecta de forma directa a la estabilidad de algunos ARNs mensajeros.

El aumento de los niveles de ARN mensajero de un gen determinado en la cepa con el gen *rnr* inactivado podría indicar que este gen fuera un sustrato directo de la RNasa R, aunque también podría ser debido a efectos indirectos, por ejemplo, que el aumento en los niveles de un gen determinado conllevara a un aumento en la transcripción de otro (no a un aumento de la estabilidad de su ARNm). Para encontrar ARN mensajeros que pudieran ser dianas directas de la RNasa R, seleccionamos una serie de genes que presentaban niveles elevados de ARNm en la cepa KTRNR1, y medimos la estabilidad de estos mensajeros tanto en la cepa KTRNR1 como en la silvestre. Estos análisis se hicieron mediante RT-PCR en tiempo real, midiendo la velocidad de degradación de cada mensajero tras la adición de

rifampicina (un inhibidor de la transcripción) en tres experimentos independientes. Los resultados se muestran en la (Figura 9).

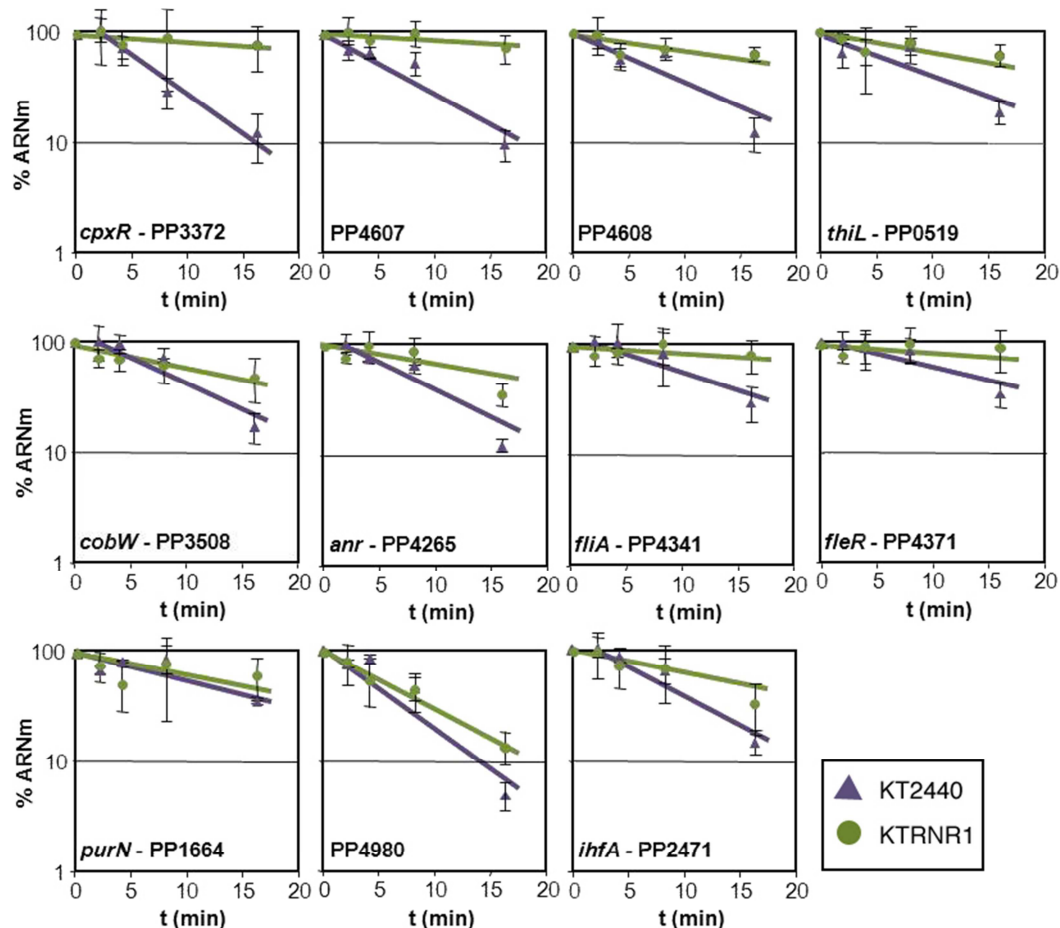


Figura 9. Estabilidad de ARN mensajeros en la cepa silvestre (KT2440) y en la cepa mutante (KTRNR1). Ambas cepas se cultivaron en medio LB a 30°C hasta alcanzar la densidad óptica de 0,6. En ese momento se añadió rifampicina a una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$ para inhibir la ARN polimerasa. A distintos tiempos se recogieron alícuotas y se procesaron para medir la cantidad de cada mensajero por RT-PCR en tiempo real. Las gráficas indican la disminución de la cantidad de cada mensajero con respecto al momento de adición de rifampicina ($t=0$).

Como puede observarse en la Tabla 4, la inactivación del gen *mrn* conllevó el aumento de la vida media de los ARNs mensajeros correspondientes a los genes *cpxR*, PP_4607, *fliA*, *fleR*, PP_4608 y *cobW*. El aumento fue más moderado para *thiL* y *purN* y pequeño o indetectable para

ihfA, *anr* y PP4980. Por lo tanto, la degradación de al menos algunos de los ARN mensajeros analizados depende directamente de la RNasa R en las condiciones estudiadas.

Tabla 4. Vida media de los ARNm de los genes indicados, en la cepa deficiente en el gen *rnr* (KTRNR1) y en la cepa silvestre (KT2440).

Gen	Vida media ARNm (min)		Incremento (nº de veces)
	KT2440 (wt)	KTRNR1 (<i>rnr</i>)	
PP3372 (<i>cpxR</i>)	5	54	11
PP4607	5	40	8
PP4341 (<i>fliA</i>)	9	>60	>6
PP4371 (<i>fleR</i>)	9,5	>60	>6
PP4608	5,5	27	5
PP3508 (<i>cobW</i>)	8	41	5
PP0519 (<i>thiL</i>)	7	30	4,3
PP1664 (<i>purN</i>)	13	40	3
PP2471 (<i>ihfA</i>)	5	11	2,2
PP4265 (<i>anr</i>)	4,5	9	2
PP4980	4	6	1,5

7.1.6 La inactivación del gen *rnr* provoca dificultades en el crecimiento a 10°C, pero no a 30°C.

Anteriormente se había observado que la inactivación del gen *rnr*, que codifica para la RNasa R, impide el crecimiento de *P. putida* KT2440 a 4°C (127) pero no se había descrito lo que ocurre a otras temperaturas. Al crecer en medio LB las cepas KT2440 y KTRNR1, así como la KTRNR1 complementada en *trans* con un plásmido que expresa el gen *rnr*, comprobamos que prácticamente no existían diferencias de crecimiento a 30°C, mientras que cuando la temperatura era de 10°C, la tasa de crecimiento era mucho menor en el mutante en el gen *rnr* que en la cepa

silvestre (Figura 10) (tiempo de duplicación $6 \pm 0,2$ h en KT2440 y $16,5 \pm 0,5$ h en KTRNR1 a 10°C). Al complementar la cepa mutante KTRNR1 con un gen *rnr* activo, comprobamos que la velocidad de crecimiento a 10°C vuelve a parecerse mucho a la de la cepa silvestre. Estos resultados fueron similares siguiendo el crecimiento mediante densidad óptica ($A = 600\text{nm}$) que haciendo recuento de células viables (datos no mostrados).

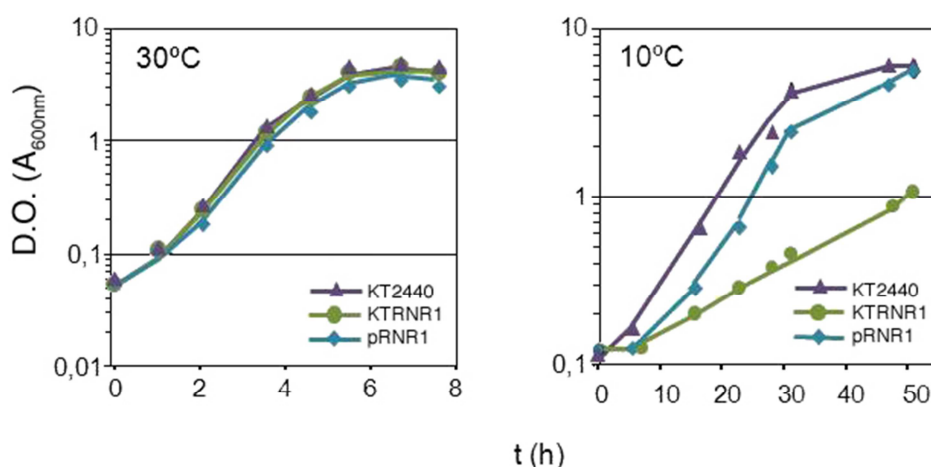


Figura 10. Crecimiento de las cepas de *P. putida* KT2440, KTRNR1 y KTRNR1 complementada con el plásmido pRNR1 (que expresa la RNasa R) en medio LB a 30°C y a 10°C .

7.1.7 Respuesta compensatoria en ausencia de la RNasa R

Cuando las células crecen en medio rico LB a 30°C , la ausencia de la RNasa R apenas afecta la velocidad de crecimiento, por lo que nos pareció interesante estudiar si se estaba dando algún tipo de respuesta compensatoria en la cepa carente de la RNasa R, es decir, si se estaban produciendo cambios en la expresión de otras enzimas relacionadas con el metabolismo del ARN que compensen la ausencia de la RNasa R. Para ello comparamos la expresión de distintos genes relacionados con el metabolismo del ARN en KT2440 y KTRNR1 por RT-PCR en tiempo real (Figura 11). En ausencia de la RNasa R, aumentaron los niveles de ARN mensajero de las RNA-helicases RhlB (PP_1295 o *rhIB*) y de RhlE (PP_4980 o *rhIE*). En cambio, otras RNA-helicases como SrmB (PP_4532 o *srmB*)

apenas se vieron afectadas. La expresión de RNasas como la RNasa E (PP_1905 o *rne*), PNPasa (PP_4708 o *pnp*) y la RNasa D (PP_4591 o *rnd*), aumentó de 2 a 2,5 veces en ausencia de la RNasa R, mientras que la expresión de la RNasa H (PP_5294 o *rnh*) y la RNasa T (PP_1085 o *rnt*) apenas varió.

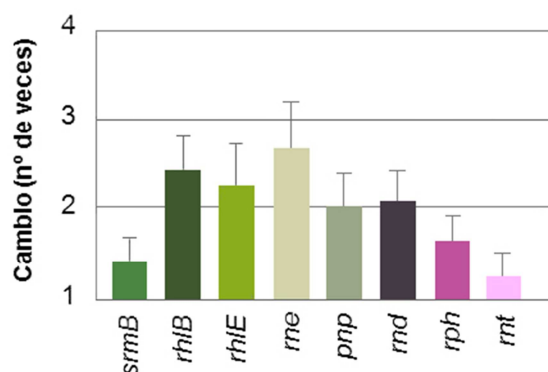


Figura 11. Variación de los niveles de ARNm de diferentes enzimas relacionadas con la degradación de ARN en la cepa KTRNR1 con respecto a la silvestre en células creciendo exponencialmente en medio LB a 30°C, analizado mediante RT-PCR en tiempo real.

7.1.8 Expresión de la RNasa R en diferentes condiciones

Se sabe que la expresión de la RNasa R es inducible por frío en *E. coli* (20, 24, 25) pero no en *P. syringae* (123). *P. putida* crece de forma óptima a 30°C, pero es capaz de crecer también a 4°C, aunque muy lentamente. El hecho de que la ausencia de la RNasa R lleve a un crecimiento más lento a 10°C, pero no a 30°C, sugiere que esta RNasa cobra más importancia a bajas temperaturas. Para ahondar más en esta cuestión, analizamos la expresión del gen *rnr* a bajas temperaturas y en otras condiciones. Como podemos ver en la Figura 12, la expresión del gen *rnr* apenas aumentó cuando la temperatura descendió bruscamente desde 30°C a 10°C durante dos horas (respecto al instante previo al golpe térmico), valor que es mucho menor que el que se ha descrito para *E. coli* (donde los niveles de la RNasa R aumentaron unas 8 durante un golpe de frío similar) (20). Además, la expresión de *rnr* fue muy parecida cuando las células

crecieron exponencialmente en medio LB a temperaturas constantes de 10°C, 20°C o 30°C (Figura 12). Se sabe que, en *E. coli*, la expresión de la RNasa R responde a situaciones de estrés como entrada en fase estacionaria o crecimiento en medio mínimo (24, 25). Cuando realizamos un análisis similar en *P. putida*, los resultados indicaron que los niveles de expresión de *rnr* a 30°C fueron similares en medio rico (LB) y en medio mínimo M9 con citrato o succinato como fuentes de carbono. Sin embargo, los niveles de mensajero de la RNasa R aumentaron unas tres veces al entrar en fase estacionaria (Figura 12). A la vista de estos resultados, se puede concluir que el patrón de expresión de la RNasa R en *P. putida* difiere del de *E. coli*.

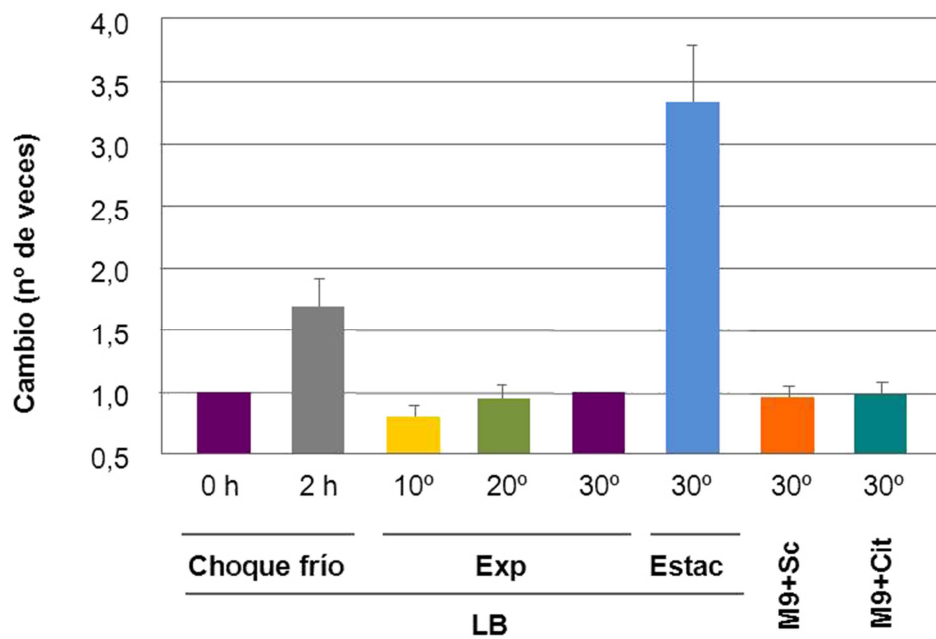


Figura 12. Expresión del gen *rnr* en diferentes condiciones medida por RT-PCR en tiempo real. Las condiciones comparadas fueron: a) 2 horas después de un golpe térmico por frío en medio LB (pasando de 30°C a 10°C) respecto a la situación inmediatamente anterior al choque (0 h). b) Crecimiento exponencial en medio LB a 10°C, 20°C o 30°C, tomando la situación a 30°C como referencia. c) Entrada en fase estacionaria ($A_{600nm} = 2,2$; [Estac]) frente a exponencial ($A_{600nm} = 0,6$ [Exp], tomada como referencia) en LB a 30°C. d) Crecimiento en fase exponencial a 30°C en medio mínimo con succinato (M9+Sc) o citrato (M9+Cit) como fuentes de carbono, comparado con LB en las mismas condiciones. Destacar que, en el caso de golpe

frío, se utilizaron los niveles de ARNm de *rpoD* como control interno en vez de los de *rpoN*.

7.2 Crecimiento de *P. putida* a baja temperatura

Como se explicó en la introducción, existen algunas evidencias que indican que la temperatura de crecimiento afecta al proceso de represión catabólica en *B. subtilis* (61) y *L. casei* (96). Aunque existen también algunas evidencias para *P. fluorescens* (89), el efecto de la temperatura en represión catabólica no se ha estudiado en las bacterias del género *Pseudomonas*. *P. putida* es una bacteria del suelo que puede crecer en un rango amplio de temperaturas, que abarca desde 4°C hasta algo más de 30°C (53, 127).

Cuando se somete a un microorganismo a un descenso brusco en la temperatura se produce una parada en el crecimiento celular, durante la cual se reorganiza la fisiología de la bacteria para poder crecer a la nueva temperatura (145). En este trabajo hemos comparado el comportamiento de *P. putida* KT2440 creciendo a 10°C con el observado a 30°C, su temperatura óptima de crecimiento. El primer análisis que realizamos fue un seguimiento de la velocidad de crecimiento en medio LB a estas dos temperaturas. Los tiempos de generación obtenidos fueron 41 ± 4 min a 30°C, y $5 \text{ h} \pm 20$ min a 10°C. Como los preinóculos de partida para las curvas de crecimiento habían sido cultivados durante 16 horas a 30°C, los cultivos reinoculados a 10°C sufrieron una paralización inicial durante 6 - 7 horas antes de retomar el crecimiento a 10°C. Las curvas se ilustran en la Figura 13.

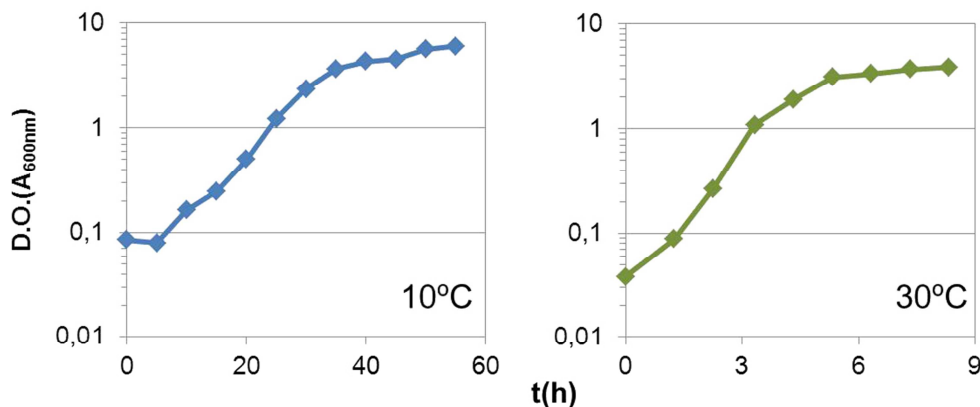


Figura 13. Curvas de crecimiento de *P. putida* KT2440 en LB a 10°C y a 30°C. El crecimiento se siguió midiendo la turbidez a 600 nm.

Para obtener una visión global de lo que ocurre durante crecimiento prolongado a bajas temperaturas en *P. putida*, decidimos comparar el transcriptoma y el proteoma de esta bacteria creciendo exponencialmente en LB a 30°C o a 10°C. En ambos casos, se partió de un cultivo de 16 horas en LB y a 30°C, se reinoculó en el mismo medio en una dilución 1:100 y se dejó crecer hasta D.O. = 0,6 a la temperatura correspondiente (30°C ó 10°C), momento en el que se recogieron las células y se procesaron para analizar el transcriptoma o el proteoma.

7.2.1 Comparación del transcriptoma de células creciendo en medio rico a 10°C o a 30°C

Para analizar el transcriptoma de las células creciendo a 10°C con el de células creciendo a 30°C utilizamos el microarray genómico para *P. putida* KT2440, analizando tres réplicas biológicas. Los niveles de ARNm de más de 205 genes variaron más de dos veces ($P < 0.05$, corregido por FDR) en células crecidas a 10°C respecto al cultivo a 30°C. En concreto, a 10°C los niveles de ARNm fueron mayores en 119 genes y menores en 86 genes. Los datos detallados para cada gen se describen en la Tabla 13. La Figura 14 muestra un resumen de los resultados, agrupando los genes por categorías funcionales.

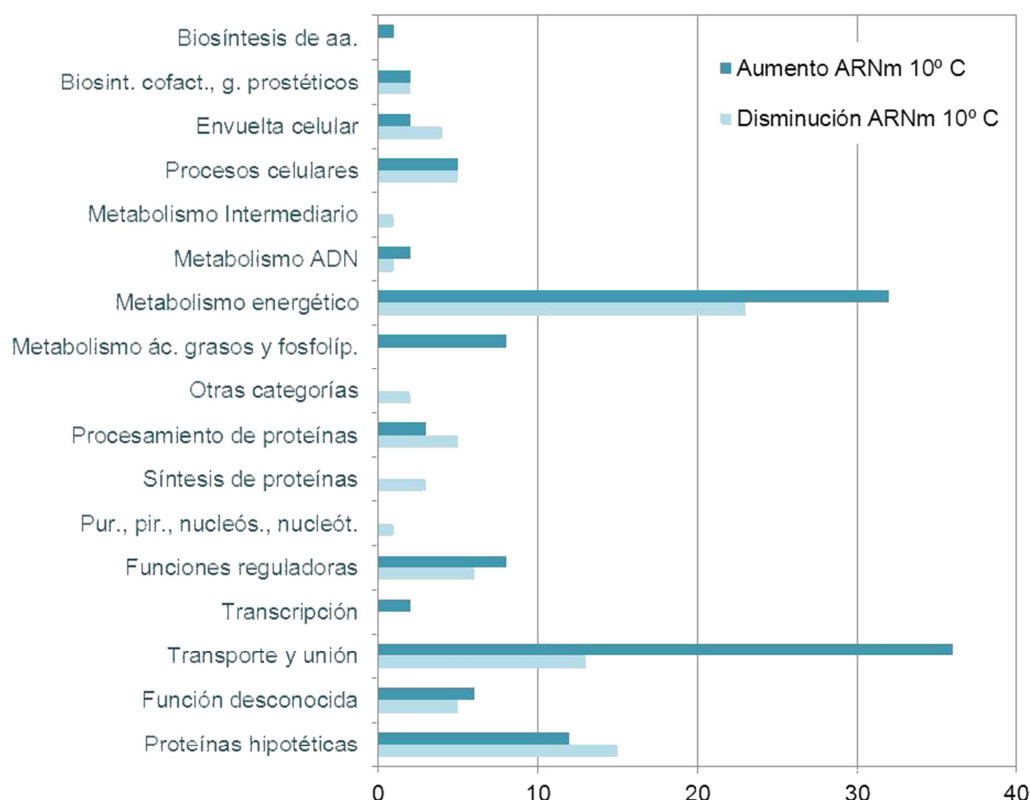


Figura 14. Genes cuyos niveles de ARNm varían en células creciendo a 10°C respecto a 30°C (variación ≥ 2 veces y $P < 0.05$), agrupados por categorías.

Los genes que mostraron una expresión diferencial pertenecen a diferentes categorías, pero destacan dos: genes de transporte y unión de sustratos y genes de metabolismo energético. El significado de estos resultados se comenta en detalle junto con el estudio comparativo de los proteomas, en el apartado 7.2.4.

7.2.2 Validación de los resultados de los *microarrays*

Con el propósito de validar los resultados anteriores, seleccionamos 12 genes que mostraban una expresión diferencial en los *microarrays* a las dos temperaturas comparadas y se analizaron los niveles de ARNm por RT-PCR en tiempo real. Los resultados (Tabla 5) confirmaron la validez de los

obtenidos con los *microarrays*, aunque el análisis por RT-PCR en tiempo real mostró, en general, valores de expresión diferencial mayores que los revelados por los *microarrays*. Asimismo, completamos la validación eligiendo 6 genes cuya expresión no variaba según los *microarrays* (Tabla 5). En cinco de ellos el resultado fue similar con las dos técnicas, mientras que para el gen *prpD* la técnica de RT-PCR detectó unos niveles de ARNm cuatro veces mayores a 10°C que a 30°. Por lo tanto, la conclusión fue que los datos obtenidos mediante *microarrays* son cualitativamente correctos, aunque los valores parecen estar subestimados.

Tabla 5. Análisis por RT-PCR de los niveles de ARNm de genes seleccionados, en células creciendo exponencialmente en LB a 10°C o a 30°C. Para comparar, la columna derecha muestra los valores obtenidos utilizando *microarrays*. "Nd" significa que no se detectó expresión diferencial con el umbral estadístico establecido (cambio ≥ 2 y $P < 0.05$).

Locus (TIGR)	Gen	Descripción	Cambio (RT-PCR)	Cambio (array)
PP_0137	<i>gltP</i>	Simportador protones:glutamato/aspartato	1,1 \pm 0,1	nd
PP_0217		Desaturasa de ácidos grasos	-1,3 \pm 0,1	nd
PP_1785	<i>rmlB</i>	4,6-deshidratasa dTDP-glucosa	-1,6 \pm 0,1	nd
PP_2112	<i>acnA</i>	Aconitato hidratasa	1 \pm 0,1	nd
PP_2136	<i>fadB</i>	Complejo oxidación ácidos grasos, subunidad- α	3,7 \pm 0,7	2,1
PP_2333		Regulador transcripcional, familia GntR	7,7 \pm 0,5	3,1
PP_2334	<i>prpB</i>	2-metilisocitrato liasa	17,6 \pm 1,0	2,9
PP_2335	<i>prpC</i>	Metilcitrato sintasa, probable	20,5 \pm 1,8	5,5
PP_2336		2-metilisocitrato hidratasa	16,6 \pm 2,5	4,0
PP_2337		Proteína accesoria de 2-metilisocitrato hidratasa, probable	14,2 \pm 2,4	2,6
PP_2338	<i>prpD</i>	2-metilcitrato dehidratasa	4,2 \pm 0,9	nd
PP_3754		β -cetotiolasa	9,8 \pm 1,3	4,8
PP_3755	<i>paaH</i>	3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa	14,8 \pm 1,6	12,0
PP_4066	<i>liuC</i>	Metilglutaconil-CoA hidratasa	20,6 \pm 2,9	4,0

Resultados

PP_4250	<i>ccoN1</i>	Citocromo c oxidasa, tipo <i>cbb3</i> , subunidad I	-83,2 ± 12	-5,7
PP_4264	<i>hemN</i>	Coproporfinógeno III oxidasa	-112 ± 15	-11,9
PP_4402	<i>bkdA2</i>	2-oxoisovalerato deshidrogenasa, subunidad β	37,2 ± 6,7	10,9
PP_4726	<i>dnaJ</i>	Chaperona, proteína DnaJ	-1,2 ± 0,1	nd

7.2.3 Comparación del proteoma de células creciendo en medio rico a 10°C o a 30°C

Se ha descrito que muchos de los cambios en la expresión génica que ocurren a baja temperatura son postranscripcionales (58, 62), por lo que nos pareció indispensable completar el estudio anterior con un análisis proteómico. Para ello comparamos el proteoma de células creciendo exponencialmente en LB a 10°C con el de células creciendo a 30°C en las mismas condiciones, empleando la tecnología 2D-DIGE y cuatro réplicas biológicas (cuatro pares de cultivos). En los cuatro geles 2D (Figura 17) se pudieron detectar un total de 1600 puntos correspondientes a proteínas. Comparando las intensidades de los puntos a cada temperatura de crecimiento se encontraron 227 cuya intensidad variaba al menos 1,5 veces en una condición respecto a la otra ($P < 0,05$, corregida por FDR). De estos 227 puntos, se extrajeron del gel 175 y se identificaron las proteínas que estaban presentes mediante MALDI/TOF MS. Algunos puntos contenían más de una proteína. Cuando fue posible, las proteínas presentes en la mezcla se identificaron por secuenciación MS/MS, pero cuando esto no aportó una información fiable los puntos no se tuvieron en cuenta. En total, diecinueve proteínas generaron más de un punto, lo que al final resultó en 103 proteínas identificadas cuyos niveles variaban entre las dos temperaturas de crecimiento comparadas. De éstas, en 67 casos los niveles fueron mayores a 10°C respecto a 30°C, y menores en otros 36 casos (Figura 15 y Tabla 14).

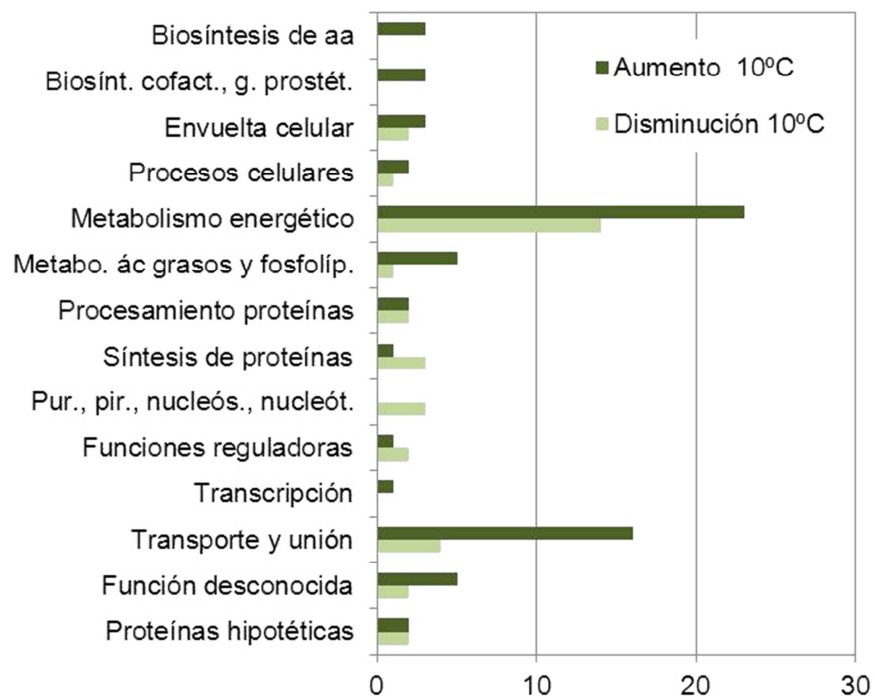


Figura 15. Proteínas cuyos niveles variaron en células creciendo a 10°C respecto a 30°C (variación $\geq 1,5$ veces y $P < 0.05$), agrupadas por categorías.

De las 103 proteínas cuyos niveles variaron, 43 correspondían a genes que también mostraban cambios significativos en los niveles de ARNm según los análisis de transcriptómica (Figura 16). En todos los casos, los cambios en ambos estudios fueron cualitativamente similares.

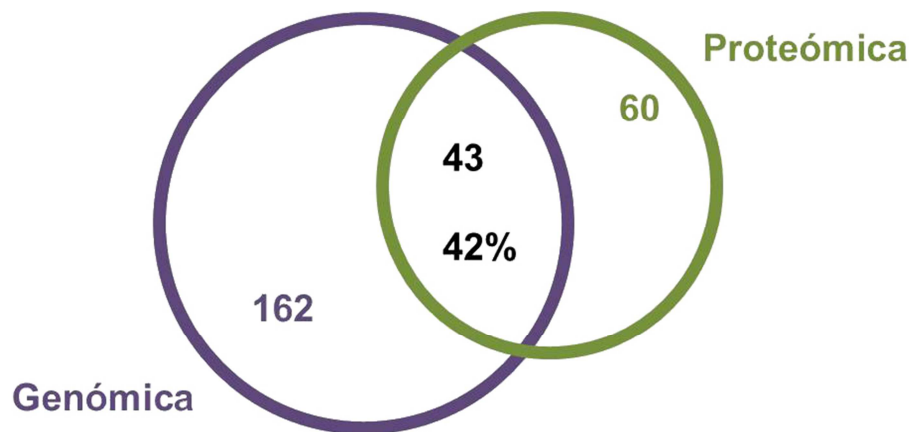


Figura 16. Diagrama de Venn que ilustra la coincidencia entre los ARNm y las proteínas que mostraron una expresión diferencial a 10°C respecto a 30°C.

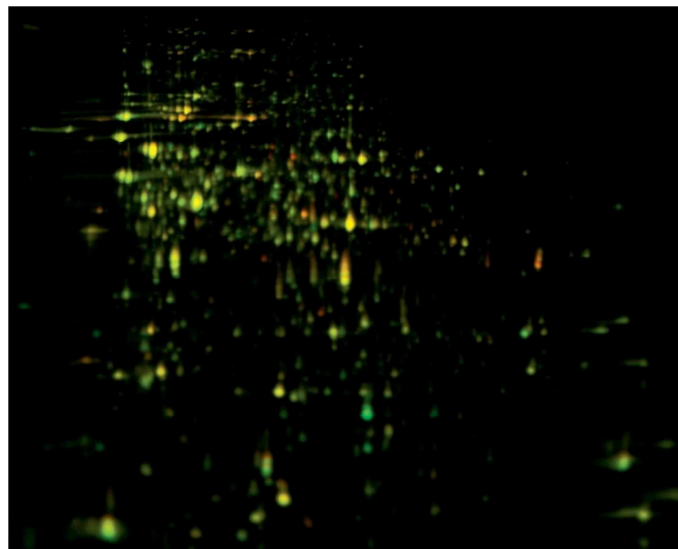


Figura 17. Imagen de uno de los cuatro geles 2D-DIGE. En este caso se marcaron con Cy3 las proteínas procedentes de los cultivos a 30°C y con Cy5 las de 10°C. Este marcaje se hizo exactamente igual con otra pareja de réplicas, y se invirtió el marcaje en los dos casos restantes.

7.2.4 Efecto de la temperatura sobre el transcriptoma y el proteoma de *P. putida*

Al combinar los resultados de transcriptómica y proteómica, se observa que el crecimiento a 10°C conlleva cambios en la expresión de al menos 265 genes, cerca de un 5% del genoma de *P. putida*. La expresión de 155 genes (el 58%) aumenta a 10°C mientras que en 110 genes (42%) disminuye.

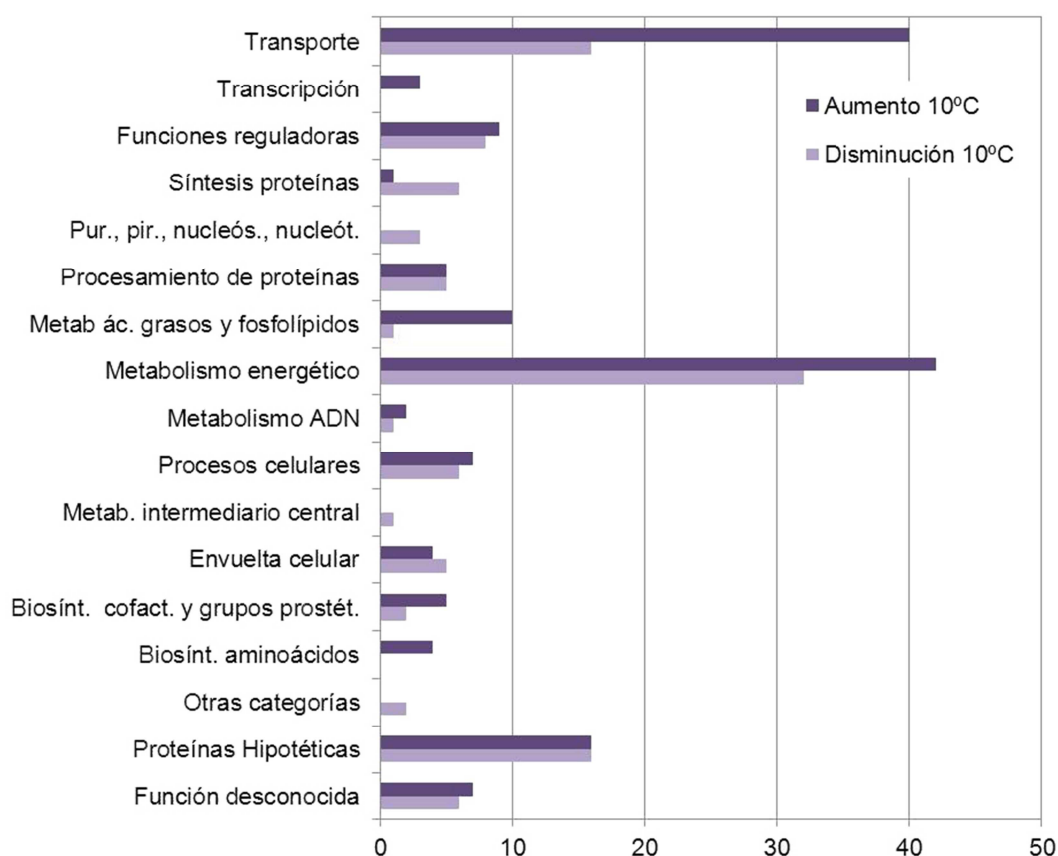


Figura 18. Genes que muestran una expresión diferencial a 10°C respecto a 30°C, según los estudios de transcriptómica y proteómica, agrupados por categorías.

La mayoría de los genes que mostraron cambios significativos a 10°C respecto a 30°C corresponden a las categorías de genes implicados en transporte y unión de sustratos, metabolismo energético y metabolismo de ácidos grasos. También es destacable que un 6% de los genes afectados

están anotados como proteínas con funciones reguladoras (Figura 18 y Tabla 6).

La función más probable de los genes expresados diferencialmente en estos ensayos se dedujo a partir de la bibliografía existente, y utilizando dos reconstrucciones metabólicas de *P. putida* KT2440 (111, 121) y la base de datos KEGG Pathway. Las conclusiones se relatan a continuación.

Tabla 6. Genes o proteínas deducidos de los resultados de genómica y proteómica con una expresión mayor o menor en células creciendo a 10°C comparado con 30°C. Sólo se indican aquellos genes que mostraron un cambio de 2 o más veces en los niveles de ARN mensajero, o de 1,5 o más en el caso de los niveles de proteínas, y cuyos cambios presentan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$, corregido por *false discovery rate*). Los valores positivos corresponden a una mayor expresión a 10°C y los negativos a una expresión menor (el inverso de la relación cambiada de signo). En el caso de proteínas que produjeron más de un punto, el valor de cambio expresado es la media de todos los puntos. “nd” significa que no se detectó un cambio significativo en niveles de ARNm, o de proteína. Los nombres de los genes y las categorías son los del genoma anotado (108) depositado en <http://www.pseudomonas.com> con algunas modificaciones. Las abreviaturas utilizadas en categoría son: BA: biosíntesis de aminoácidos; BC: biosíntesis de cofactores, grupos prostéticos y portadores; EC: envuelta celular; FD: función desconocida; ; FR: funciones reguladoras; MA: metabolismo del ADN; MAGF: metabolismo de ácidos grasos y fosfolípidos; MCI: metabolismo central intermediario; ME: metabolismo energético; OC: otras categorías; PC: procesos celulares; PH: proteínas hipotéticas; PP: procesamiento de proteínas; PPNN: purinas, pirimidinas, nucleósidos y nucleótidos; PTU: proteínas de transporte y unión; SP: síntesis de proteínas; T: transcripción.

TIGR locus	Gen	Descripción	Categoría	Función	Cambio mRNA	Cambio Proteína
PP_0838	<i>suhB</i>	Inositol-fosfato fosfatasa	BA	Biosíntesis de histidina	nd	2,7
PP_1025	<i>leuA</i>	2-isopropilmalato sintasa	BA	Biosíntesis de leucina	nd	1,6
PP_1866		fosfo-2-dehidro-3-deoxiheptonato aldolasa	BA	Aminoácido biosíntesis	nd	1,6
PP_2324	<i>aroF-1</i>	fosfo-2-dehidro-3-desoxiheptonato aldolasa clase I	BA	Familia aminoácidos aromáticos	2,4	nd
PP_2913	<i>hemB-1</i>	ácido delta-aminolevulínico deshidratasa	BC	Biosíntesis cofactores y grupos prostéticos	nd	1,8
PP_3781		familia oxígeno-independiente Coproporfinógeno III oxidasa	BC	Síntesis de hemo, porfirina, y cobalamina	3,2	nd

Resultados

PP_4264	<i>hemN</i>	coproporphyrinógeno III oxidasa	BC	Síntesis de hemo, porfirina, y cobalamina	-11,9	nd
PP_4597	<i>moaA</i>	biosíntesis cofactor molibdeno, proteína A	BC	Molibdopterina	-2,1	nd
PP_4868	<i>pncB</i>	nicotinato fosforibosiltransferasa	BC	Metabolismo de nucleótidos piridina	2,0	nd
PP_4869	<i>nadE</i>	NAD sintetasa	BC	Síntesis de NAD	nd	1,6
PP_4993	<i>gshB</i>	glutación sintetasa	BC	Síntesis de glutación	nd	1,6
PP_0168	<i>lapA</i>	proteína de adhesión a superficies LapA	EC	Adhesión celular	-2,5	nd
PP_0933	<i>mreB</i>	proteína determinante de la forma bacilar MreB	EC	Proteína de determinante forma bacilar	nd	-1,7
PP_0957		proteína familia KpsF/GutQ	EC	Metabolismo de carbohidratos (formación cápsula)	nd	1,5
PP_1185	<i>oprH</i>	proteína de membrana externa H1	EC	Proteína membrana externa	-11,7	-3,0
PP_1249		lipoproteína, probable	EC	Envuelta celular	-4,7	nd
PP_1784	<i>rmID</i>	dTDP-4-dehidrorramnosa reductasa	EC	Biosíntesis y degradación de lipopolisacáridos y polisacáridos de superficie	nd	2,2
PP_3821	<i>galU</i>	UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa	EC	Biosíntesis y degradación de lipopolisacáridos y polisacáridos de superficie	2,2	1,6
PP_4115		secretina pili tipo IV PilQ, probable	EC	Biogénesis pili	-2,3	nd
PP_5269	<i>dadX</i>	alanina racemasa, catabólica	EC	Biosíntesis y degradación de peptidoglicano	2,8	nd
PP_1669		proteína familia NLP/P60	FD	Peptidasa, función desconocida	2,4	nd
PP_2201		hidrolasa, familia plegamiento alfa/beta	FD	Función desconocida	nd	1,8

PP_2486		flavin oxidorreductasa NADH-dependiente, familia Oye	FD	Enzima de especificidad desconocida	-2,2	-2,0
PP_2912		proteín-quinasa, probable	FD	Función desconocida	3,1	nd
PP_3248		proteína familia peroxidasa tipo Dyp	FD	Enzima de especificidad desconocida	-3,1	nd
PP_3437		proteína dominio CBS	FD	Función desconocida	-2,4	nd
PP_3547		oxidorreductasa, familia deshidrogenasa/reductasa	FD	Enzima de especificidad desconocida	-2,0	nd
PP_3925		proteína familia enzima fosfotransferasa	FD	Función desconocida	2,3	nd
PP_4588		nitroreductasa	FD	Función desconocida	nd	-1,7
PP_4813		proteína familia PAP2 / proteína familia DedA	FD	Función desconocida	-2,1	nd
PP_5092		proteína familia NLP/P60	FD	Función desconocida	4,1	nd
PP_5218		proteína familia DedA	FD	Proteína membrana, función desconocida	2,3	nd
PP_5278		aldehido deshidrogenasa	FD	Aldehido deshidrogenasa, función desconocida	2,7	2,7
PP_0298		regulador transcripcional, familia AraC	FR	Regulador transcripcional	3,0	nd
PP_0807		regulador transcripcional dependiente sigma-54	FR	Regulador transcripcional	-5,3	nd
PP_0841		regulador transcripcional, familia BadM/Rrf2	FR	Regulador transcripcional	2,0	nd
PP_1186	<i>phoP</i>	Regulador transcripcional PhoP	FR	Regulador transcripcional	-5,6	nd
PP_1187	<i>phoQ</i>	proteína sensora PhoQ	FR	Sistemas de dos componentes	-2,7	nd
PP_1313		regulador transcripcional, familia AraC	FR	Regulador transcripcional	2,6	nd

Resultados

PP_1761		proteínas con caja sensorial GGDEF	FR	Diguanilato ciclasa dominio (GGDEF), transducción de señales	nd	1,7
PP_2333		regulador transcripcional, familia GntR	FR	Regulador transcripcional	3,1	nd
PP_2457	<i>rbsR</i>	represor del operón ribosa	FR	Regulador transcripcional	2,8	nd
PP_3552		histidin-quinasa, dominio sensor PAS/PAC, transducción señales	FR	Sensor histidin-quinasa	2,6	nd
PP_3592		regulador transcripcional, familia RpiR	FR	Regulador transcripcional	4,5	nd
PP_3756		regulador transcripcional, familia TetR	FR	Regulador transcripcional	3,7	nd
PP_4515		regulador transcripcional, familia MarR	FR	Regulador transcripcional	-2,1	nd
PP_4693		proteína familia DksA/TraR con dedo de zinc tipo C4	FR	Proteína DksA, unión RNA polimerasa, probable	nd	-1,7
PP_5047	<i>ntrB</i>	caja sensora histidin quinasa NtrB	FR	Sistema de dos componentes, metabolismo nitrógeno	-2,4	nd
PP_5048	<i>ntrC</i>	regulador de respuesta NtrC, sistema de dos componentes	FR	Sistema de dos componentes, metabolismo nitrógeno	-3,4	nd
PP_5324		regulador de respuesta, sistema de dos componentes	FR	Regulador respuesta sistema de dos componentes	nd	-2,0
PP_2143	<i>lexA-1</i>	represor LexA	MA	Regulador transcripcional	2,1	nd
PP_4741	<i>hsMA</i>	sistema restricción-modificación tipo I, subunidad M	MA	Modificación/restricción ADN	-2,1	nd
PP_4919		proteína familia MutT/nudix, hidrolasa NUDIX	MA	Metabolismo de purinas	2,0	nd
PP_2136	<i>fadB</i>	complejo de oxidación de ácidos grasos, subunidad alfa	MAGF	Degradación de ácidos grasos	2,1	nd
PP_2137	<i>fadA</i>	3-cetoacil-CoA tiolasa	MAGF	Degradación de ácidos grasos	nd	1,6
PP_3553		Acil-CoA sintetasa	MAGF	Metabolismo lípidos	18,7	nd

PP_3554		Acil-CoA deshidrogenasa	MAGF	Metabolismo lípidos	5,2	2,4
PP_3754		beta-cetotiolasa	MAGF	Metabolismo lípidos	4,8	2,0
PP_3755	<i>paaH</i>	3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa	MAGF	Degradación de butanoato	12,0	2,4
PP_3926		oxidoreductasa, familia deshidrogenasa/reductasa de cadenas cortas	MAGF	Metabolismo ácidos graso y fosfolípidos	2,5	nd
PP_4063		ligasa ácido graso cadena larga-CoA, probable	MAGF	Metabolismo lípidos	3,3	nd
PP_4175	<i>fabB</i>	3-oxoacil-(proteína portadora acilo)sintasa I	MAGF	Metabolismo ácidos graso y fosfolípidos	nd	-1,7
PP_4549	<i>fadD</i>	ligasa de ácido graso de cadena larga-CoA	MAGF	Degradación de ácidos grasos	2,5	nd
PP_4550	<i>fadD2</i>	acil-CoA sintetasa	MAGF	Degradación de ácidos grasos	nd	2,6
PP_5347	<i>accC-2</i>	piruvato carboxilasa	MCI	Conversión Piruvato a oxaloacetato	-2,7	nd
PP_0322	<i>glyA-1</i>	serin hidroximetiltransferasa	ME	Metabolismo serina/glicina	nd	1,9
PP_0596		beta alanina-piruvato transaminasa	ME	Degradación de L-valina	2,5	2,3
PP_1009	<i>gap-1</i>	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, tipo I	ME	Metabolismo glucosa y fructosa	nd	1,8
PP_1011	<i>glk</i>	glucoquinasa	ME	Metabolismo glucosa	2,0	1,6
PP_1022	<i>zwf-1</i>	glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa	ME	Metabolismo glucosa	nd	1,8
PP_1024	<i>eda</i>	2-dehidro-3-desoxifosfogluconato aldolasa/4-hidroxi-2-oxoglutarato aldolasa	ME	Metabolismo glucosa y gluconato	2,0	nd
PP_1073	<i>glpD</i>	glicerol-3-fosfato deshidrogenasa	ME	Metabolismo de glicerol	-3,1	nd
PP_1075	<i>glpK</i>	glicerol quinasa	ME	Metabolismo de glicerol	nd	-1,5
PP_1143		3-hidroxi-isobutirato deshidrogenasa	ME	Degradación de Leu, Val, Ile	nd	1,6

Resultados

PP_1157		acetolactato sintasa, catabólica, probable	ME	Metabolismo energético	-2,9	nd
PP_1251	<i>mgo-2</i>	malato:quinona oxidorreductasa	ME	Ciclo ATC	-2,4	-1,7
PP_1362	<i>pykA</i>	piruvato quinasa II	ME	Metabolismo piruvato	2,2	nd
PP_1389		carboxifosfoenolpiruvato fosfonomutasa, probable	ME	Metabolismo Carbohidratos	-2,4	-1,9
PP_1791		4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa	ME	Metabolismo de fenilalanina	nd	1,6
PP_1808	<i>pgi</i>	glucosa-6-fosfato isomerasa	ME	Metabolismo de fructosa	nd	1,6
PP_1972	<i>tyrB-1</i>	aminotransferasa aminoácidos aromáticos	ME	Metabolismo de aminoácidos aromáticos	-2,9	-1,8
PP_2149	<i>gap-2</i>	gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa	ME	Glicolisis/gluconeogénesis	-2,2	nd
PP_2334	<i>prpB</i>	2-metilisocitrato liasa	ME	Ciclo 2-metilcitrato	2,9	4,1
PP_2335	<i>prpC</i>	metilcitrato sintasa, probable	ME	Ciclo 2-metilcitrato	5,5	2,4
PP_2336		2-metilisocitrato hidratasa	ME	Ciclo 2-metilcitrato	4,0	2,2
PP_2337		proteína accesorio de la 2-metilisocitrato hidratasa, probable	ME	Ciclo 2-metilcitrato	2,6	nd
PP_2448		g-glutamilputrescina oxidasa, probable	ME	Metabolismo arginina y prolina	nd	6,9
PP_3365		acetolactato sintasa, catabólica, probable	ME	Síntesis de acetolactato	-4,6	nd
PP_3383	<i>gadB</i>	gluconato 2-deshidrogenasa, subunidad aceptora	ME	Ruta pentosas fosfato	2,4	5,4
PP_3384		gluconato 2-deshidrogenasa, subunidad aceptora	ME	Ruta pentosas fosfato	2,9	nd
PP_3416	<i>gnuK</i>	gluconoquinasa	ME	Ruta pentosas fosfato	5,7	2,4
PP_3433	<i>hpd</i>	4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa	ME	Metabolismo tyrosina y fenilalanina	4,6	nd

PP_3443		gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, probable	ME	Metabolismo glucosa/fructosa	4,5	nd
PP_3596		D-aminoácido deshidrogenasa, subunidad pequeña	ME	Metabolismo de aminoácidos	4,5	nd
PP_3662		descarboxilasa	ME	Posible lisina descarboxilasa,	2,7	1,7
PP_3745	<i>glcD</i>	glicolato oxidasa, subunidad GlcD	ME	Metabolismo glicolato/glioxilato	5,2	nd
PP_3747	<i>glcF</i>	glicolato oxidasa, subunidad hierro-azufre	ME	Metabolismo glicolato/glioxilato	2,6	nd
PP_3839		alcohol deshidrogenasa dependiente de zinc	ME	Alcohol deshidrogenasa, sustrato desconocido	-7,7	nd
PP_4012		isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP	ME	Ciclo ATC	2,2	1,7
PP_4064	<i>liuA</i>	isovaleril-CoA deshidrogenasa	ME	Metabolismo aminoácidos ramificados	3,7	nd
PP_4065	<i>liuB</i>	3-metilcrotonil-CoA carboxilasa, subunidad beta	ME	Metabolismo aminoácidos ramificados	3,9	2,5
PP_4066	<i>liuC</i>	metilglutaconil-CoA hidratasa	ME	Metabolismo aminoácidos ramificados	4,0	nd
PP_4067	<i>liuD</i>	acetil-CoA carboxilasa, biotina carboxilasa	ME	Metabolismo aminoácidos ramificados	4,0	nd
PP_4120	<i>nuoB</i>	NADH deshidrogenasa, subunidad B	ME	Transporte de electrones	nd	-1,6
PP_4123	<i>nuoF</i>	NADH deshidrogenasa, subunidad F	ME	Transporte de electrones	nd	-1,6
PP_4124	<i>nuoG</i>	NADH deshidrogenasa, subunidad G	ME	Transporte de electrones	-2,1	-1,8
PP_4125	<i>nuoH</i>	NADH deshidrogenasa, subunidad H	ME	Transporte de electrones	-2,2	nd
PP_4126	<i>nuoI</i>	NADH deshidrogenasa, subunidad I	ME	Transporte de electrones	nd	-1,6
PP_4127	<i>nuoJ</i>	NADH deshidrogenasa, subunidad J	ME	Transporte de electrones	-2,1	nd
PP_4131	<i>nuoN</i>	NADH deshidrogenasa, subunidad N	ME	Transporte de electrones	-2,1	nd

Resultados

PP_4190	<i>sdhB</i>	Succinato deshidrogenasa, subunidad hierro-azufre	ME	Ciclo ATC	nd	-1,9
PP_4191	<i>sdhA</i>	succinato deshidrogenasa, subunidad flavoproteína	ME	Ciclo ATC	nd	-1,6
PP_4194	<i>gltA</i>	citrato sintasa	ME	Ciclo ATC	2,1	nd
PP_4250	<i>ccoN-1</i>	citocromo c oxidasa tipo cbb3, subunidad I	ME	Transporte de electrones	-5,7	nd
PP_4252	<i>ccoQ-1</i>	citocromo c oxidasa tipo cbb3, subunidad CcoQ	ME	Transporte de electrones	-3,3	nd
PP_4253	<i>ccoP-1</i>	citocromo c oxidasa tipo cbb3, subunidad III	ME	Transporte de electrones	-2,1	nd
PP_4259		proteína accesorio de la citocromo c oxidasa	ME	Transporte de electrones	-2,8	nd
PP_4401	<i>bkdA1</i>	2-oxoisovalerato deshidrogenasa, subunidad alfa	ME	Metabolismo aminoácidos ramificados	4,9	nd
PP_4402	<i>bkdA2</i>	2-oxoisovalerato deshidrogenasa, subunidad beta	ME	Metabolismo aminoácidos ramificados	10,9	nd
PP_4403	<i>bkdB</i>	2-oxoisovalerato deshidrogenasa, componente lipoamida aciltransferasa	ME	Metabolismo aminoácidos ramificados	7,0	nd
PP_4404	<i>lpdV</i>	2-oxoisovalerato deshidrogenasa, componente lipoamida deshidrogenasa	ME	Metabolismo aminoácidos ramificados	3,8	1,7
PP_4487	<i>acsA</i>	acetil-CoA sintetasa	ME	Metabolismo de acetato	4,1	3,5
PP_4490	<i>phhA</i>	fenilalanina-4-hidroxilasa	ME	Metabolismo fenilalanina	2,3	nd
PP_4491	<i>phhB</i>	pterina-4-alfa-carbinolamina deshidratasa	ME	Metabolismo fenilalanina	4,1	2,8
PP_4493		glicolato oxidasa, subunidad GlcD, probable	ME	Enzima de especificidad desconocida	-2,7	nd
PP_4547		glutamina sintetasa, probable	ME	Metabolismo glutamina/glutamato	2,0	nd
PP_4570		Aspartil/Asparaginil beta-hidrolasa, probable	ME	Metabolismo de aminoácidos	-2,6	nd

PP_4736	<i>lldD</i>	L-lactato deshidrogenasa	ME	Conversión lactato a piruvato	nd	2,2
PP_4811	<i>proA</i>	gamma-glutamil fosfato reductasa	ME	Metabolismo de glutamato/prolina	nd	-1,9
PP_4870		azurina	ME	Transporte de electrones	-2,5	nd
PP_4947	<i>putA</i>	prolina deshidrogenasa/delta-1-pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa	ME	Metabolismo de aminoácidos	2,6	nd
PP_5046	<i>glnA</i>	glutamina sintetasa tipo I	ME	Metabolismo glutamina/glutamato	-2,7	nd
PP_5056	<i>pgm</i>	fosfoglicerato mutasa independiente de 2,3-bifosfoglicerato	ME	Metabolismo de azúcares	-2,2	-1,9
PP_5150	<i>rpiA</i>	ribosa 5-fosfato isomerasa	ME	Ruta pentosas fosfato	-2,3	nd
PP_5184		glutamina sintetasa, probable	ME	Metabolismo glutamina/glutamato	nd	1,9
PP_5267		citocromo c5	ME	Transporte de electrones	-4,3	nd
PP_5270	<i>dadA-2</i>	D-aminoácido deshidrogenasa (deaminasa)	ME	Metabolismo de aminoácidos	nd	6,4
PP_5289	<i>argB</i>	Acetilglutamato quinasa	ME	Metabolismo de glutamato	nd	-1,5
PP_5338	<i>aspA</i>	aspartato amonio-liasa	ME	Metabolismo Ala y Asp	nd	-1,7
PP_4745		ISPpu15, transposasa Orf2	OC	Funciones transposón	-2,0	nd
PP_5405		transposasa, proteína emparentada con TnsB	OC	Funciones transposón	-2,0	nd
PP_1209		proteína con dominio de golpe de frío	PC	Adaptación a condiciones atípicas	-7,6	nd
PP_1733	<i>minD</i>	proteína de septación MinD	PC	División celular	nd	-2,2
PP_1794	<i>afpA</i>	proteína secretada anticongelante AfpA	PC	Proteína secretada; actividad anticongelante	nd	2,1
PP_1819		transductor de quimiotaxis, proteína aceptora de metilos	PC	Quimiotaxis y motilidad	2,1	nd

Resultados

PP_2439	<i>ahpC</i>	alquil hidroperóxido reductasa, subunidad C	PC	Detoxificación	-2,4	nd
PP_2487		aldehido deshidrogenasa, probable	PC	Adaptación a condiciones atípicas	-2,3	nd
PP_2648		proteína de estrés universal	PC	Adaptación a condiciones atípicas	-6,1	nd
PP_3444		glioxalasa/ proteína de resistencia a bleomicina /dioxigenasa	PC	Detoxificación	3,9	nd
PP_3509		glioxalasa/ proteína de resistencia a bleomicina	PC	Resistencia a bleomicina	2,6	nd
PP_4104		proteína familia glutatión S-transferasa	PC	Detoxificación	2,2	nd
PP_4393	<i>cheV-3</i>	proteína de quimiotaxis CheV	PC	Quimiotaxis y motilidad	nd	2,0
PP_4641	<i>cstA</i>	proteína de ayuno de carbono CstA	PC	Adaptación a condiciones atípicas	2,2	nd
PP_5090		proteína división celular FtsN, probable	PC	División celular	-2,2	nd
PP_0153		Proteína hipotética	PH	Proteína hipotética	-2,5	nd
PP_0886		Proteína hipotética	PH	Proteína hipotética	nd	3,7
PP_1149		Proteína hipotética	PH	Proteína hipotética	-9,6	nd
PP_1230		Proteína hipotética	PH	Proteína hipotética	nd	1,7
PP_1233		Proteína hipotética	PH	Proteína hipotética	-2,3	nd
PP_1742		Proteína hipotética	PH	Proteína hipotética	7,3	nd
PP_2099		Proteína hipotética	PH	Proteína hipotética	2,6	nd
PP_2223		Proteína hipotética	PH	Proteína hipotética	nd	-4,2
PP_2550		Proteína hipotética	PH	Proteína hipotética	-2,3	nd
PP_2644		Proteína hipotética	PH	Proteína hipotética	2,5	nd

PP_2874		Proteína hipotética	PH	Proteína hipotética	-3,0	nd
PP_3418		Proteína hipotética	PH	Proteína hipotética	5,3	nd
PP_3434		Proteína hipotética	PH	Proteína hipotética	3,2	nd
PP_3504		Proteína hipotética	PH	Proteína hipotética	-4,8	nd
PP_3610		Proteína hipotética	PH	Proteína hipotética	-2,3	nd
PP_3749		Proteína hipotética	PH	Proteína hipotética	2,0	nd
PP_3780		Proteína hipotética	PH	Proteína hipotética	7,0	nd
PP_3782		Proteína hipotética	PH	Proteína hipotética	3,7	nd
PP_4087		Proteína hipotética	PH	Proteína hipotética	2,0	nd
PP_4163		Proteína hipotética	PH	Proteína hipotética	2,2	2,2
PP_4200		Proteína hipotética	PH	Proteína hipotética	nd	1,7
PP_4249		Proteína hipotética	PH	Proteína hipotética	-2,2	nd
PP_4291		Proteína hipotética	PH	Proteína hipotética	-2,2	nd
PP_4292		Proteína hipotética	PH	Proteína hipotética	-3,3	nd
PP_4293		Proteína hipotética	PH	Proteína hipotética	-2,5	-4,4
PP_4640		Proteína hipotética	PH	Proteína hipotética	2,3	nd
PP_5156		Proteína hipotética	PH	Proteína hipotética	nd	1,5
PP_5232		Proteína hipotética	PH	Proteína hipotética	-6,9	nd
PP_5279		Proteína hipotética	PH	Proteína hipotética	3,6	nd
PP_5391		Proteína hipotética	PH	Proteína hipotética	-2,2	nd

Resultados

PP_5392		Proteína hipotética	PH	Proteína hipotética	-14,2	nd
PP_5395		Proteína hipotética	PH	Proteína hipotética	-2,4	nd
PP_0308		dipeptidasa, probable	PP	Degradación de proteínas, péptidos, y glicopéptidos	2,2	nd
PP_0684	<i>fkIB-1</i>	peptidil-prolil cis-trans isomerasa	PP	Plegamiento proteínas	nd	2,5
PP_2206		peptidasa, familia U32	PP	Degradación de proteínas, péptidos, y glicopéptidos	-2,8	nd
PP_3316		ATPasa con actividad chaperona, probable	PP	Plegamiento proteínas y estabilización	2,0	nd
PP_4179	<i>htpG</i>	proteína de golpe de calor HtpG 90	PP	Plegamiento proteínas y estabilización	-3,4	-2,1
PP_4280		XdhC, factor accesorio xantina deshidrogenasa, probable	PP	Xantina deshidrogenasa plegamiento y estabilización	2,1	nd
PP_4727	<i>dnaK</i>	chaperona molecular DnaK	PP	Plegamiento proteínas y estabilización	-2,3	-1,5
PP_4728	<i>grpE</i>	proteína de golpe de calor GrpE	PP	Asistencia chaperona DnaK	-2,1	nd
PP_4849		proteína familia DnaK, probable	PP	Plegamiento proteínas y estabilización	-2,1	nd
PP_5113		proteína con dominio peptidasa M16	PP	Degradación de proteínas y péptidos	nd	1,8
PP_0747		Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa	PPNN	Metabolismo purina	nd	-2,4
PP_5265	<i>xpt</i>	xantina fosforribosiltransferasa	PPNN	Rescate de nucleósidos y nucleótidos	-2,8	-1,9
PP_5296	<i>gmk</i>	guanilato quinasa	PPNN	Interconversiones nucleótidos nucleósidos	nd	-1,6
PP_0178		transportador eflujo, proteína fusión membrana, probable	PTU	Bomba eflujo	-2,2	nd
PP_0268	<i>oprQ</i>	porina de membrana externa	PTU	Porinas	nd	-1,5

PP_0283		transportador ABC de aminoácidos, proteína de unión de ATP	PTU	Transporte de aminoácidos	nd	-1,7
PP_0482		Bacterioferritina	PTU	Transporte y unión proteínas	nd	1,5
PP_0504	<i>oprG</i>	proteína de membrana externa OprG	PTU	Porinas	-17,7	nd
PP_0799		porina, probable	PTU	Porinas	-2,5	nd
PP_0868		transportador ABC de glicina betaína/ carnitina/ colina, proteína de unión de ATP, probable	PTU	Transporte de aminoácidos	2,8	2,5
PP_0869		transportador ABC de glicina betaína/ carnitina/ colina, proteína permeasa, probable	PTU	Transporte de aminoácidos	2,0	nd
PP_0870		región de unión sustrato del sistema de transporte ABC glicina betaína	PTU	Transporte de aminoácidos	2,1	1,6
PP_0871		transportador ABC de glicina betaína/ carnitina/ colina, proteína permeasa, probable	PTU	Transporte de aminoácidos	2,5	nd
PP_0882	<i>dppA</i>	transportador ABC de dipéptidos, proteína periplásmica de unión de dipéptidos	PTU	Transporte de dipéptidos	2,8	nd
PP_0883	<i>opdP</i>	porina OpdP, probable	PTU	Transporte de dipéptidos	3,1	3,4
PP_0884		transportador ABC de dipéptidos	PTU	Transporte de dipéptidos	nd	2,1
PP_0885		transportador ABC de dipéptidos, proteína periplásmica de unión de dipéptidos	PTU	Transporte de dipéptidos	5,2	1,7
PP_1015	<i>gtsA</i>	transportador ABC de azúcares, proteína periplásmica de unión de sustrato	PTU	Transporte de glucosa	4,2	1,8
PP_1016	<i>gtsB</i>	transportador ABC de azúcares, permeasa	PTU	Transporte de glucosa	2,5	nd
PP_1017	<i>gtsC</i>	transportador ABC de azúcares, permeasa	PTU	Transporte de glucosa	3,7	nd
PP_1018	<i>gtsD</i>	transportador ABC de azúcares, subunidad de unión de ATP	PTU	Transporte de glucosa	3,0	2,8
PP_1019	<i>oprB-1</i>	porina B	PTU	Incorporación de glucosa	3,2	1,9

Resultados

PP_1059		permeasa de aminoácidos	PTU	Transporte de aminoácidos	4,9	nd
PP_1068	<i>aatP</i>	transportador ABC de aminoácidos, proteína unión de ATP	PTU	Transporte de aminoácidos ácidos	5,6	nd
PP_1069	<i>aatM</i>	transportador ABC de aminoácidos, permeasa	PTU	Transporte de aminoácidos ácidos	4,3	nd
PP_1070	<i>aatQ</i>	transportador ABC de aminoácidos, permeasa	PTU	Transporte de aminoácidos ácidos	4,9	nd
PP_1071	<i>aatJ</i>	transportador ABC aminoácidos, proteína periplásmica de unión de aminoácidos	PTU	Transporte de aminoácidos ácidos	4,3	3,0
PP_1137	<i>braG</i>	transportador ABC de aminoácidos ramificados, proteína de unión de ATP	PTU	Transporte de aminoácidos	nd	1,9
PP_1138	<i>braF</i>	transportador ABC de aminoácidos ramificados, proteína de unión de ATP	PTU	Transporte de aminoácidos	2,7	nd
PP_1139	<i>braE</i>	proteína de transporte de aminoácidos ramificados de alta afinidad	PTU	Transporte de aminoácidos	2,2	nd
PP_1140	<i>braD</i>	transportador ABC de aminoácidos ramificados, permeasa	PTU	Transporte de aminoácidos	3,2	nd
PP_1141	<i>braC</i>	transportador ABC de aminoácidos ramificados, proteína periplásmica de unión de aminoácidos	PTU	Transporte de aminoácidos	3,9	2,5
PP_1188	<i>dctA</i>	proteína transporte de C4-dicarboxilatos	PTU	Transporte de ácidos orgánicos	-2,7	nd
PP_1206	<i>oprD</i>	porina D	PTU	Porinas	4,2	3,1
PP_1222	<i>tolB</i>	proteína de translocación TolB	PTU	Sistema de transporte Tol, componente periplásmico	nd	-1,6
PP_1297	<i>aapJ</i>	transportador ABC general de aminoácidos, proteína periplásmica de unión	PTU	Transporte de aminoácidos	2,1	nd
PP_1400		transportador de dicarboxilatos MFS	PTU	Transporte de ácidos dicarboxílicos	2,4	nd

PP_1689		transportador de ácidos grasos de cadena larga, probable	PTU	Transporte de ácido grasos	2,2	nd
PP_1743		simportador familia sodio:soluto	PTU	Transporte, sustrato desconocido	6,3	nd
PP_2089	<i>oprF</i>	porina familia OmpF	PTU	Porinas	nd	2,0
PP_2454	<i>rbsB</i>	transportador ABC de ribosa, proteína periplásmica de unión de ribosa	PTU	Transporte azúcares	3,8	2,1
PP_2455	<i>rbsA</i>	transportador ABC de ribosa, proteína de unión de ATP	PTU	Transporte azúcares	2,9	nd
PP_3176		transportador familia MFS	PTU	Transporte, sustrato desconocido	10,8	nd
PP_3368		transportador familia MFS	PTU	Transporte, sustrato desconocido	-3,3	nd
PP_3417	<i>gntP</i>	transportador de gluconato	PTU	Transporte gluconato	5,6	nd
PP_3593		transportador ABC de aminoácidos, proteína periplásmica de unión de aminoácidos	PTU	Transporte de aminoácidos	6,0	1,6
PP_3594		transportador ABC de aminoácidos, permeasa	PTU	Transporte de aminoácidos	2,3	nd
PP_3597		transportador ABC de aminoácidos, proteína de unión de ATP	PTU	Transporte de aminoácidos	3,1	nd
PP_3764		porina, probable	PTU	Porinas	-2,1	-1,7
PP_4103		transportador de baja afinidad de fosfato inorgánico	PTU	Transporte de fosfato	-2,6	nd
PP_4184	<i>braZ</i>	sistema III de transporte de aminoácidos ramificados, proteína portadora	PTU	Transporte de aminoácidos ramificados	2,1	nd
PP_4653		permeasa de xantina/uracilo/vitamina C	PTU	Incorporación de xantina/uracilo/vitamina C	-2,2	nd
PP_4735	<i>lctP</i>	transportador de L-lactato	PTU	Transporte de ácidos orgánicos	-2,3	nd

Resultados

PP_4863		transportador ABC de aminoácidos ramificados, proteína de unión ATP	PTU	Transporte de aminoácidos	2,0	nd
PP_4881		transportador ABC de hierro, proteína periplásmica unión hierro, probable	PTU	Transporte de hierro	-2,0	nd
PP_4946	<i>putP</i>	simportador sodio/prolina	PTU	Transporte prolina	2,5	nd
PP_5177	<i>potI</i>	transportador ABC de putrescina, permeasa	PTU	Transporte putrescina	-2,0	nd
PP_5206		proteína de secreción, familia HlyD	PTU	Proteína secreción	-3,2	nd
PP_5207		transportador ABC, proteína de unión de ATP/permeasa	PTU	Transportador de membrana, sustrato desconocido	-2,3	nd
PP_0452	<i>tuf</i>	factor de elongación Tu	SP	Síntesis de proteínas	nd	-2,1
PP_1641		proteína con dominio lazo-PP	SP	Modificación tRNA	nd	-1,6
PP_2583		proteína ribosomal-alanina N-acetiltransferasa, probable	SP	Biogénesis ribosomas	-2,1	nd
PP_4654	<i>trmA</i>	tRNA (uracil-5-)-metiltransferasa	SP	Modificación bases tRNA y rRNA	-2,0	nd
PP_4874	<i>rplI</i>	proteína ribosomal (50S) L9	SP	Proteína ribosomal	nd	-1,9
PP_4879		RNA methyltransferasa	SP	Modificación bases tRNA y rRNA	nd	1,6
PP_5089	<i>argS</i>	arginil-tRNA sintetasa	SP	Actividad arginina-tRNA ligasa	-2,3	nd
PP_1623	<i>rpoS</i>	factor sigma RpoS de la RNA polimerasa	T	Factor sigma RNA polimerasa	2,1	nd
PP_4142	<i>rnhA</i>	ribonucleasa H	T	Degradación de ARN	2,2	nd
PP_4708	<i>pnp</i>	polinucleótido fosforilasa/poliadenilasa	T	Degradación de ARNm	nd	1,9

7.2.4.1 Modificaciones en componentes de la envuelta celular a 10°C

Cuando baja la temperatura, la fluidez de las membranas disminuye. Dado que el correcto funcionamiento de la membrana requiere que tenga una fluidez óptima, esencial para la supervivencia de la bacteria, los microorganismos responden a cambios en la fluidez de las membranas mediante un proceso denominado adaptación homeoviscosa (138). Existen diversas estrategias, y muchas implican modificaciones en los ácidos grasos de la membrana (30, 169). Varios genes implicados en la degradación de ácidos grasos que podrían estar relacionados con modificaciones en la fluidez de la membrana, como *fadA*, *fadB*, *fadD*, *fadD2* y *paaH* aumentaron su expresión a 10°C frente a 30°C (Tabla 6). Asimismo, también se modificó la expresión de muchos genes que presumiblemente están implicados en el metabolismo de ácidos grasos pero cuya función no está clara todavía.

Por otra parte, el crecimiento de *P. putida* KT2440 a bajas temperaturas conllevó una mayor expresión de bastantes proteínas implicadas en la biosíntesis y degradación de polisacáridos y lipopolisacáridos de superficie de la membrana externa. La reducción en la longitud de las cadenas laterales polisacarídicas de los lipopolisacáridos, o en la cantidad de lipopolisacárido presente, pueden incrementar la fluidez de la membrana externa (132). Según nuestros resultados, la expresión de una probable lipoproteína (PP_1249) disminuyó a 10°C, aunque aumentó la de algunos genes involucrados en la producción de exopolisacáridos como *rmID* o *galU*. Además, la expresión de la porina OprH fue menor a 10°C (Tabla 6). Esta porina está relacionada con la estabilidad de la membrana. Curiosamente, la expresión de *oprH* está activada por el sistema regulador de dos componentes PhoP-PhoQ (90), cuya expresión a 10°C también fue menor. Por último, también es destacable la menor expresión del gen *lapA* a bajas temperaturas; este gen codifica para la proteína LapA, implicada en la adhesión de la célula a superficies (47).

7.2.4.2 Cambios a 10°C en los procesos de transcripción, traducción y procesamiento de proteínas

La tasa de crecimiento de *P. putida* KT2440 es mucho menor a 10°C que a 30°C. Sin embargo no se observaron cambios significativos en la expresión de genes que codifican para componentes de la RNA polimerasa,

excepto en el caso del factor sigma alternativo RpoS, cuyos niveles a 10°C aumentaron.

Cuando la temperatura es baja cabe esperar que la degradación del ARN sea más problemática debido a la mayor estabilidad de las estructuras secundarias. De acuerdo con esta idea, la expresión de la RNasa H y de la PNPasa (polinucleótido fosforilasa) fue mayor a 10°C (Tabla 6).

Otro problema al que tiene que enfrentarse un microorganismo cuando desciende la temperatura es el correcto plegamiento de las proteínas (51, 141). Las células tienen que reorganizar sus niveles de chaperonas y proteasas para lidiar con el estrés producido por las bajas temperaturas (143). Según los resultados obtenidos en nuestro estudio, el crecimiento de *P. putida* KT2440 a 10°C implicó una menor expresión de las chaperonas DnaK, HtpG, y de la co-chaperona GrpE que asiste a DnaK (Tabla 6). Por el contrario, la expresión de algunas proteasas y peptidasas dedicadas al desmantelamiento de proteínas aumentó (PP_0308, PP_5113 y la peptidil-prolil isomerasa FkIB-1).

7.2.4.3 Modificaciones en la cadena de transporte de electrones a baja temperatura.

La expresión de los genes *nuo*, cuyo producto es la NADH deshidrogenasa translocadora de protones tipo 1, disminuyó su expresión a 10°C (Tabla 6). Asimismo, disminuyó la expresión de la succinato deshidrogenasa, enzima que, además de participar en el ciclo de Krebs, también cede electrones a la cadena de transporte. Estos resultados sugieren que la actividad de la cadena de transporte de electrones se reduce a bajas temperaturas.

P. putida posee una cadena de transporte de electrones ramificada con múltiples oxidasas terminales, cuya proporción relativa se ajusta según las condiciones ambientales (150). A 10°C, se observó una clara reducción de los niveles de la oxidasa terminal Cbb3-1 (Tabla 6) y de la proteína de transferencia de electrones azurina (PP_4870).

7.2.4.4 Cambios en genes implicados en metabolismo

Resultados previos del laboratorio (100) habían demostrado que, cuando *P. putida* crece en medio LB a 30°C, utiliza principalmente aminoácidos y pequeños péptidos como fuente de carbono y nitrógeno. Tal y como se representa esquemáticamente en la Figura 19 y en la Tabla 6, el crecimiento a 10°C conlleva un aumento en la expresión de genes que codifican los sistemas de transporte para la incorporación de aspartato y glutamato (genes *aatJQMP*), de prolina (el simportador PutP sodio/prolina), de valina, leucina e isoleucina (los genes *braGEFD*, *braC* y *braZ*), de dipéptidos (la porina OpdP y el sistema de transporte codificado por los genes *dppA*-PP_0884-PP_0885). Además, también se observó mayor expresión a 10°C de otros genes anotados como aminopermeasas, y componentes de otros sistemas de transporte de aminoácidos peor caracterizados como PP_1059, PP_3593, PP_3594, PP_3597, PP_4863 o *aapJ*. El aumento en la expresión de los genes implicados en el transporte de aminoácidos también se vio acompañado, en muchos de los casos, de un aumento en los niveles de genes encargados de su asimilación. Así por ejemplo, se observó una mayor expresión de genes involucrados en la asimilación de prolina (*putA*), valina, leucina e isoleucina (*bkdA1A2B*, *ipdV*, *liuABCD*), fenilalanina y tirosina (*phhAB* y *hpd*).

Por otra parte, el medio rico LB contiene carbohidratos además de los aminoácidos y los péptidos (11). *P. putida* KT2440 metaboliza la glucosa y el gluconato a través de la ruta Entner-Doudoroff, ya que la ruta de la glucólisis está incompleta por la ausencia de la 6-fosfofructoquinasa (108, 153). Al crecer en LB a 10°C, la expresión de genes involucrados en la asimilación de glucosa fue mayor que a 30°C, mientras que la expresión de los genes encargados de la entrada y catabolismo inicial de la fructosa no varió. Finalmente, a bajas temperaturas aumentó la expresión de los genes *rbsA* y *rbsB*, implicados en el transporte de ribosa.

Las variaciones observadas en el metabolismo de aminoácidos y azúcares a bajas temperaturas incluyen cambios en enzimas cuyos productos pueden incorporarse al Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos (CAT), como por ejemplo el acetil-CoA o compuestos que forman parte de este ciclo. Estos cambios estuvieron acompañados por ajustes en la expresión de enzimas del ciclo ATC. El gen *gltA*, que codifica para la enzima encargada de incorporar el acetil-CoA al ciclo de Krebs (obteniendo citrato) y el gen PP_4012, que codifica para la isocitrato deshidrogenasa, aumentaron su

Resultados

expresión a 10°C. Por el contrario, la expresión de la malato-quinona deshidrogenasa (Mqo-2), que también forma parte del ciclo de Krebs, disminuyó a 10°C.

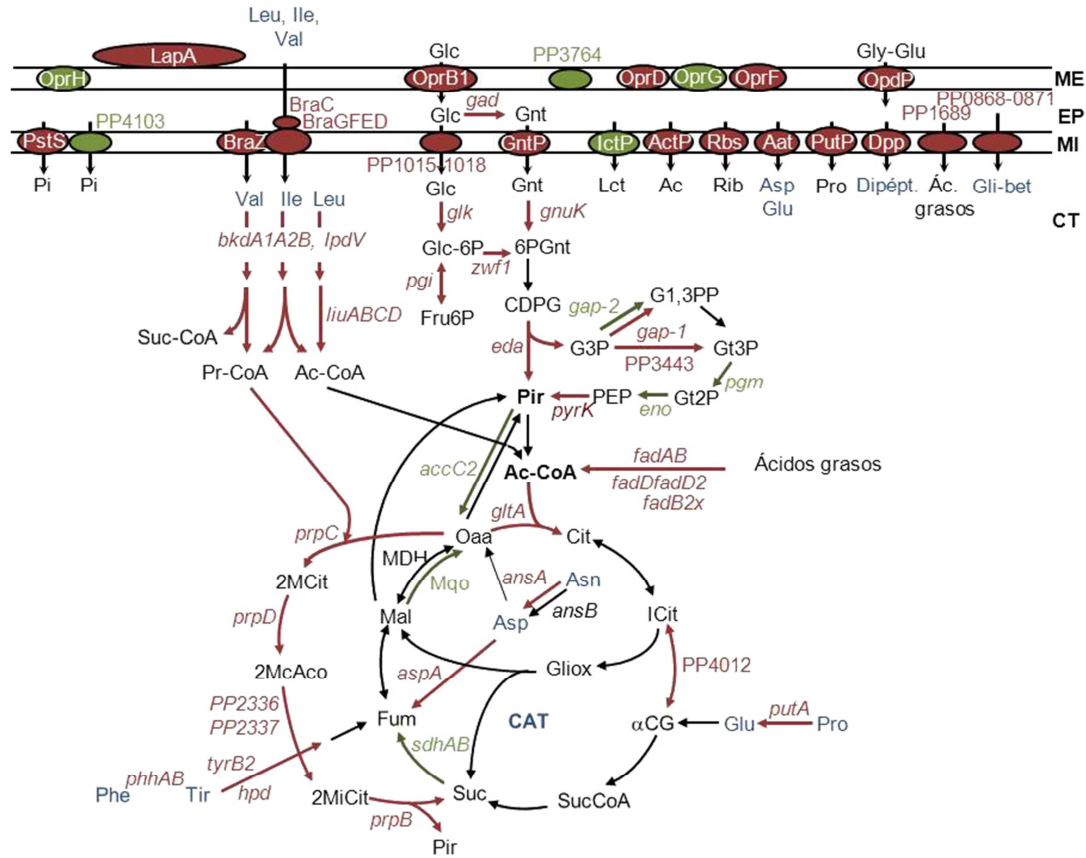


Figura 19. Cambios observados en el metabolismo de *P. putida* KT2440 creciendo a 10°C con respecto a 30°C. El esquema está muy simplificado y sólo se muestran las rutas importantes. La envuelta celular se representa en la parte superior e incluye porinas relevantes, proteínas o transportadores (ME: membrana externa; EP: espacio periplásmico; MI: membrana interna; CT: citoplasma). Los genes o proteínas cuya expresión es mayor a 10°C que a 30°C están representados en rojo, mientras que aquellos cuya expresión es menor se representan en verde. Las flechas negras representan pasos para los que no se encontraron diferencias significativas entre ambas temperaturas. Las abreviaturas utilizadas fueron: glucosa (Glc), gluconato (Gnt), 6-fosfogluconato (6-PGnt); glucosa-6-fosfato (Glc-6P), Fructosa-6-fosfato (Fru-6P), 2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato (CDPG), gliceraldehido-3-fosfato (G3P), gliceraldehido-1,3-difosfato (G1,3PP), 3-fosfoglicerato (Gt3P), 2-fosfoglicerato (Gt2P), fosfoenolpiruvato (PEP), piruvato (Pir), acetil-CoA (Ac-CoA), citrato (Cit), isocitrato (ICit), α-cetoglutarato (αCG), succinil-CoA (SucCoA), succinato (Suc), fumarato (Fum), malato (Mal), oxalacetato (Oaa), propionil-CoA (Pr-CoA), 2-metilcitrato (2MCit), 2-metil-cis-aconitato (2McAco), 2-metilisocitrato (2MiCit), lactato (Lct), acetato (Ac), ribosa (Rib), glicil-betaína (Gli-bet), fosfato inorgánico (Pi), ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA).

Un resultado que nos pareció llamativo es la inducción a 10°C del denominado ciclo del 2-metilisocitrato (*prpBC-PP2336-PP2337-prpD*) (Figura 19). Muchos microorganismos utilizan esta ruta para catabolizar propionato y propionil-CoA, que son transformados inicialmente en 2-metilcitrato y procesados hasta generar succinato y piruvato (48, 71, 72, 106, 144). Hasta el momento no se había asociado esta ruta a crecimiento a bajas temperaturas. El propionil-CoA puede proceder de la degradación de la valina, de la isoleucina y de los ácidos grasos de cadena impar (Figura 19) (82, 151). La expresión de genes relacionados con el transporte y asimilación de aminoácidos ramificados, así como de genes de degradación de ácidos grasos, aumentó a 10°C. Esto sugiere que, a 10°C, se produce mayor cantidad de propionil-CoA, que se cataboliza a través del ciclo de 2-metilcitrato.

Dado que la asociación entre bajas temperaturas y el ciclo del 2-metilisocitrato no se había descrito, decidimos profundizar en este tema. Algunos intermediarios de esta ruta son tóxicos para la célula e inhiben el crecimiento, al menos en *Salmonella* (70), por lo que un mutante en pasos intermedios de esta ruta permitiría comprobar si se está produciendo mayor cantidad de propionil-CoA a 10°C, y si éste se está metabolizando a través de esta ruta.

En el laboratorio, disponíamos de una cepa que tiene inactivado el gen PP_2336, que codifica para una 2-metilisocitrato dehidratasa (cepa PP2336) (95), analizamos su capacidad de crecimiento en medio mínimo suplementado con diferentes fuentes de carbono (citrato, succinato, acetato y propionato) (Figura 20). Tal y como era de esperar, la cepa PP2336, cuya ruta del 2-metilisocitrato está interrumpida, no fue capaz de crecer en propionato, mientras que sí crecía en otras fuentes de carbono (Figura 20). En medio rico LB a 30°C, las velocidades de crecimiento del mutante y de la cepa silvestre fueron esencialmente las mismas (Figura 21) mientras que, cuando la temperatura fue de 10°C, la velocidad de crecimiento en la cepa mutante fue un 41% menor que la cepa silvestre (5,3 horas la cepa silvestre y 7,5 la cepa mutante). Esto sugiere que a 10°C se está produciendo mayor cantidad de propionato que a 30°C, compuesto que en la cepa mutante PP2336 da lugar a la acumulación de intermediarios tóxicos, inhibiendo el crecimiento.

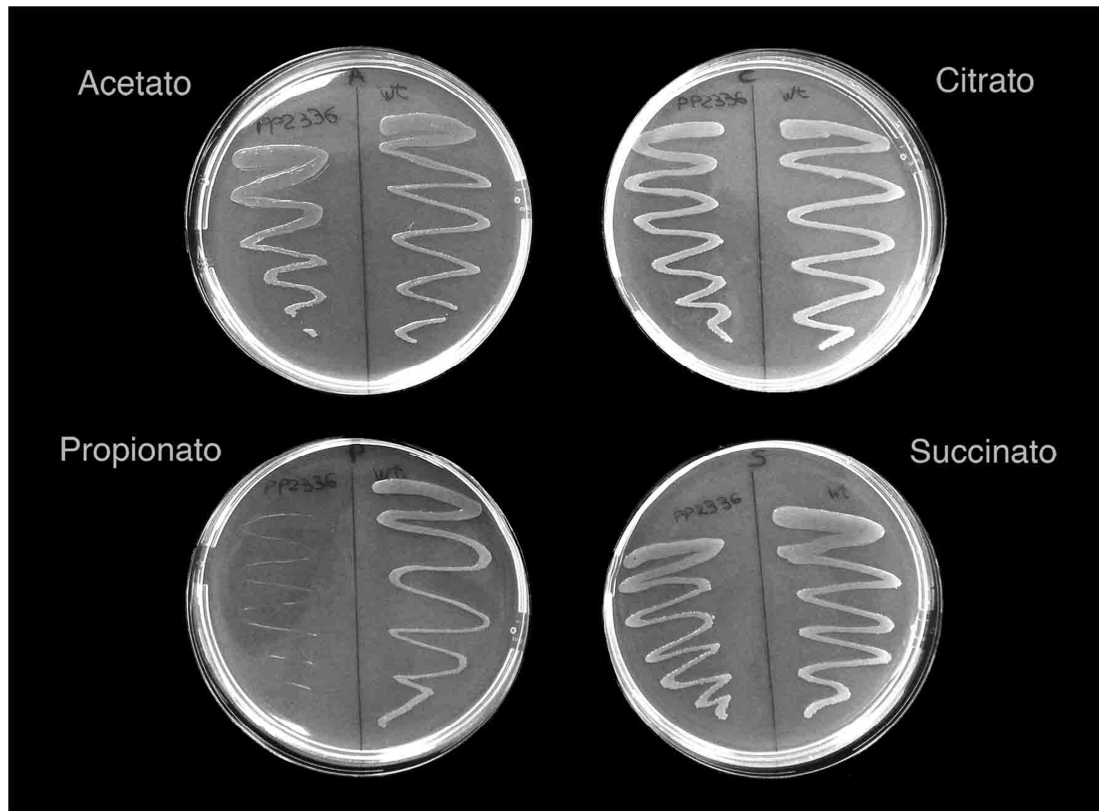


Figura 20. Crecimiento de la cepa PP2336 (parte izquierda de las placas) y la cepa silvestre (parte derecha) en medio mínimo suplementado con diferentes fuentes de carbono, e incubadas a 30°C durante 24 h (citrato y succinato), o 48 h (acetato y propionato).

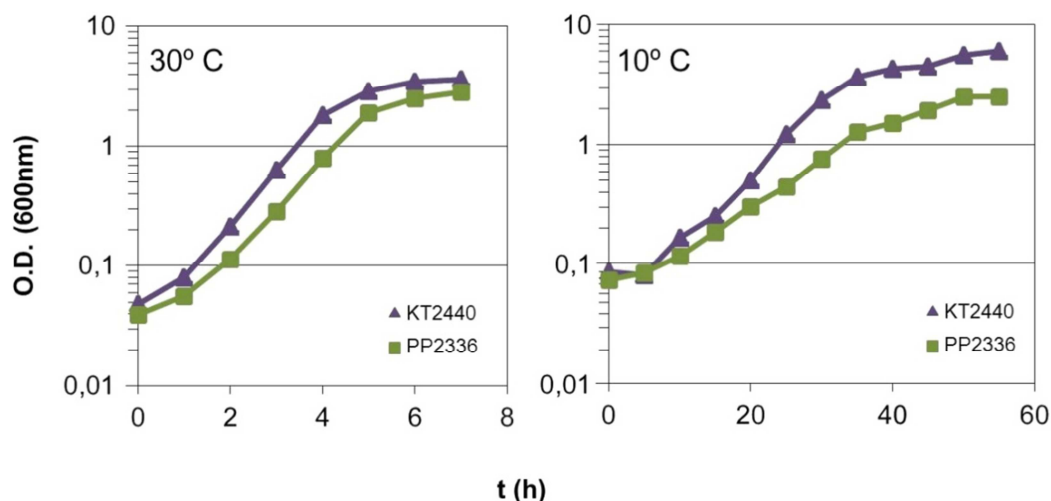


Figura 21. Crecimiento de las cepas KT2440 y PP2336 en medio LB a 30°C (izquierda) y a 10°C (derecha). En el caso de 30°C, los tiempos de duplicación fueron de 44 min. para KT2440 y de 46 min. para PP2336. A 10°C, estos tiempos aumentaron a 5,3 h para KT2440 y a 7,5 h para PP2336.

7.3 Represión catabólica a baja temperatura

Al observar los cambios que se producen en el transcriptoma y en el proteoma de *P. putida* cuando crece en medio LB a 10°C, respecto a cuando lo hace a 30°C, llama la atención que muchos de los genes o proteínas cuya expresión aumenta a 10°C se sabe que esán sometidos a represión catabólica cuando las células crecen en LB a 30°C. Más exactamente, un buen número de ellos están regulados por la proteína Crc. Esta proteína es el principal regulador de la represión catabólica en *Pseudomonas*. Actúa como un represor que inhibe la traducción de un gran número de genes, entre ellos diversos activadores transcripcionales, transportadores y enzimas, cuando existen en el medio fuentes de carbono preferentes. Para ello, Crc se une a una secuencia desapareada presente en algunos ARNs mensajeros, inhibiendo su traducción (101, 103). Decidimos analizar este aspecto con más detalle.

7.3.1 Un tercio de los genes expresados diferencialmente en un mutante en el gen *crc* a 30°C también se ven afectados cuando la célula crece a baja temperatura

El efecto de inactivar *crc* en células creciendo exponencialmente en medio LB se ha estudiado anteriormente mediante transcriptómica y proteómica diferencial (100). Por lo tanto, comparamos estos datos con los obtenidos en esta tesis mediante diagramas de Venn (113). Tal y como puede verse en la Figura 22, de los 134 que componen el regulón de Crc, 44 también se vieron afectados al crecer las células a 10°C. Dicho de otra forma, un 33% de los genes controlados directa o indirectamente por la proteína Crc también varían su expresión al disminuir la temperatura (Tabla 7). Esto sugiere que el efecto de Crc a 10°C podría ser menor que a 30°C, o afectar a menos genes que a 30°C, y que la represión catabólica está parcialmente liberada a bajas temperaturas. La mayoría de los genes cuya expresión varía en los dos casos pertenecen al grupo funcional de proteínas implicadas en el transporte y unión de sustratos o en metabolismo energético, reforzando la idea de que esta coincidencia está relacionada con la función de Crc en represión catabólica.

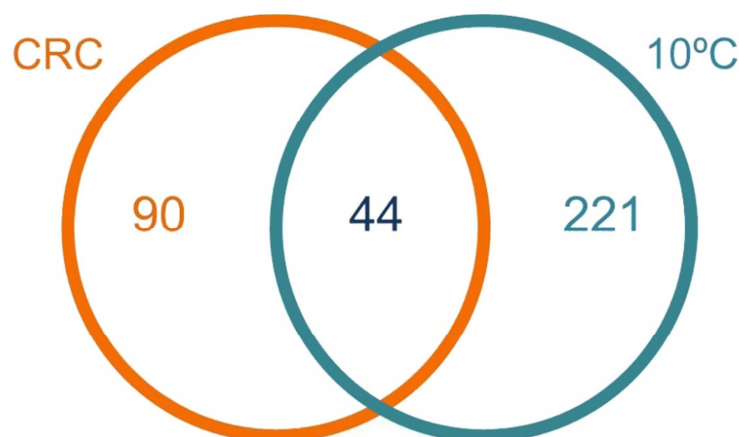


Figura 22. Diagrama de Venn que muestra el grado de coincidencia entre el regulón de Crc a 30°C con los genes expresados diferencialmente cuando las células crecen a 10°C. Se indica el número de genes expresados diferencialmente en cada condición, y los que lo hacen en las dos condiciones.

Tabla 7. Genes que cambian de forma cualitativamente similar tanto en el regulón de frío como en el regulón de Crc a 30°C. Los valores obtenidos al comparar el transcriptoma y el proteoma de células creciendo a 10°C con células creciendo a 30°C corresponden a los ensayos descritos en este trabajo, mientras que la comparación del transcriptoma y proteoma de una cepa carente del regulador Crc frente a su cepa isogénica, en células creciendo a 30°C provienen del trabajo de Moreno et al. 2009 (100). En ambos casos, las células se cultivaron en medio LB y se recogieron en fase exponencial. Las abreviaturas utilizadas son: MAGF: metabolismo de ácidos grasos y fosfolípidos; ME: metabolismo energético; PH: proteínas hipotéticas; PTU: proteínas de transporte y unión.

TIGR locus	Gen	Descripción	Categoría	Función	10°C vs 30°C		crc ⁻ vs wt 30°C	
					Cambio ARNm	Cambio Proteína	Cambio ARNm	Cambio Proteína
PP_3754		Beta-cetotiolasa	MAGF	Metabolismo de lípidos	4,8	2,0	nd	2,3
PP_4063		Acil-CoA ligasa, probable	MAGF	Metabolismo de lípidos	3,3	nd	3,5	nd
PP_1024	<i>eda</i>	2-deshidro-3-desoxifosfogluconato aldolasa	ME	Metabolismo de glucosa y gluconato	2,0	nd	nd	2,1
PP_1251	<i>mgo-2</i>	Malato:quinona oxidoreductasa	ME	Ciclo de Krebs (ATC)	-2,4	-1,7	-2,9	-10,6
PP_1808	<i>pgi</i>	Glucosa-6-fosfato isomerasa	ME	Metabolismo de fructosa	nd	1,6	nd	7
PP_2334	<i>prpB</i>	2-Metilisocitrato liasa	ME	Ciclo 2-metilcitrato	2,9	4,1	3,3	3,6
PP_2335	<i>prpC</i>	Metilcitrato sintasa, probable	ME	Ciclo 2-metilcitrato	5,5	2,4	6	nd
PP_2336		2-Metilisocitrato hidratasa	ME	Ciclo 2-metilcitrato	4,0	2,2	4,9	nd
PP_2337		Proteína accesoria de la 2-metilisocitrato hidratasa, probable	ME	Ciclo 2-metilcitrato	2,6	nd	4	nd

Resultados

PP_3433	<i>hpd</i>	4-Hidroxifenilpiruvato dioxigenasa	ME	Metabolismo de tirosina y fenilalanina	4,6	nd	11	8
PP_4064	<i>liuA</i>	Isovaleril-CoA deshidrogenasa	ME	Metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada	3,7	nd	5,3	2,3
PP_4065	<i>liuB</i>	3-Metilcrotonil-CoA carboxilasa, subunidad beta	ME	Metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada	3,9	2,5	5,6	3,9
PP_4066	<i>liuC</i>	Metilglutaconil-CoA hidratasa	ME	Metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada	4,0	nd	5	nd
PP_4067	<i>liuD</i>	Acetil-CoA carboxilasa, biotina carboxilasa	ME	Metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada	4,0	nd	4,2	nd
PP_4123	<i>nuoF</i>	NADH deshidrogenasa I, subunidad F	ME	Transporte de electrones	nd	-1,6	nd	-4,0
PP_4401	<i>bkdA1</i>	2-Oxoisovalerato deshidrogenasa, subunidad alfa	ME	Metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada	4,9	nd	3,2	1,6
PP_4402	<i>bkdA2</i>	2-Oxoisovalerato deshidrogenasa, subunidad beta	ME	Metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada	10,9	nd	5	nd
PP_4403	<i>bkdB</i>	2-Oxoisovalerato deshidrogenasa, componente lipoamida aciltransferasa	ME	Metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada	7,0	nd	2,9	12,1
PP_4404	<i>lpdV</i>	2-Oxoisovalerato deshidrogenasa, componente lipoamida deshidrogenasa	ME	Metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada	3,8	1,7	3,6	3,7
PP_4490	<i>phhA</i>	Fenilalanina-4-hidroxilasa	ME	Metabolismo de Fenilalanina	2,3	nd	2,8	1,9
PP_4491	<i>phhB</i>	Pterina-4-alfa-carbinolamina deshidratasa	ME	Metabolismo de Fenilalanina	4,1	2,8	4	nd

PP_5270	<i>dadA-2</i>	D-Aminoácido deshidrogenasa (desaminar)	ME	Metabolismo de Aminoácidos	nd	6,4	nd	19
PP_3434		Proteína hipotética	PH	Proteína hipotética	3,2	nd	6,7	nd
PP_4293		Proteína hipotética	PH	Proteína hipotética	-2,5	-4,4	-1,4	-1,8
PP_0882	<i>dppA</i>	Transportador ABC de dipéptidos, proteína periplásmica de unión de dipéptidos	PTU	Transporte de dipéptidos	2,8	nd	nd	2,8
PP_0883	<i>opdP</i>	Porina OpdP; dipéptidos	PTU	Transporte de dipéptidos	3,1	3,4	1,5	3,5
PP_0884		Transportador ABC de dipéptidos	PTU	Transporte de dipéptidos	nd	2,1	nd	4,3
PP_0885		Transportador ABC de dipéptidos, proteína periplásmica de unión de dipéptidos	PTU	Transporte de dipéptidos	5,2	1,7	3,7	9,2
PP_1015	<i>gtsA</i>	Transportador ABC de azúcares, proteína periplásmica de unión de azúcares	PTU	Transporte de glucosa	4,2	1,8	2,3	4,9
PP_1017	<i>gtsC</i>	Transportador ABC de azúcares, permeasa	PTU	Transporte de glucosa	3,7	nd	2,8	nd
PP_1018	<i>gtsD</i>	Transportador ABC de azúcares, subunidad de unión de ATP	PTU	Transporte de glucosa	3,0	2,8	2,6	5,3
PP_1019	<i>oprB-1</i>	Porina B	PTU	Incorporación de glucosa	3,2	1,9	3,5	2,9
PP_1059		Aminoácido-permeasa	PTU	Transporte de aminoácidos	4,9	nd	6,4	nd
PP_1068	<i>aatP</i>	Transportador ABC de aminoácidos, proteína unión ATP	PTU	Transporte de aminoácidos ácidos	5,6	nd	3,4	nd

Resultados

PP_1069	<i>aatM</i>	Transportador ABC de aminoácidos, proteína permeasa	PTU	Transporte de aminoácidos ácidos	4,3	nd	3,1	nd
PP_1070	<i>aatQ</i>	Transportador ABC de aminoácidos, permeasa	PTU	Transporte de aminoácidos ácidos	4,9	nd	3,9	nd
PP_1071	<i>aatJ</i>	Transportador ABC de aminoácidos, proteína periplásmica de unión de aminoácidos	PTU	Transporte de aminoácidos ácidos	4,3	3,0	3,3	7,7
PP_1141	<i>braC</i>	Transportador ABC de aminoácidos de cadena ramificada, proteína periplásmica de unión de aminoácidos	PTU	Transporte de aminoácidos	3,9	2,5	1,8	2,9
PP_1400		Transportador de dicarboxilatos, familia MFS	PTU	Transporte de ácidos dicarboxílicos	2,4	nd	2,5	nd
PP_2454	<i>rbsB</i>	Transportador ABC de ribosa, proteína periplásmica de unión de ribosa	PTU	Transporte de azúcares	3,8	2,1	1,8	3,8
PP_3593		Transportador ABC de aminoácidos, proteína periplásmica de unión de aminoácidos	PTU	Transporte de aminoácidos	6,0	1,6	nd	6,3
PP_3764		Porina, probable	PTU	Porinas	-2,1	-1,7	-2,9	nd
PP_4735	<i>lctP</i>	Transportador de L-lactato	PTU	Transporte de ácidos orgánicos	-2,3	nd	-3	nd

7.3.2 Efecto del crecimiento a baja temperatura sobre la represión catabólica que inhibe la inducción de las rutas de degradación de alcanos y de benzoato

El que muchos de los genes cuya expresión varía cuando la temperatura es baja estén regulados por Crc parece sugerir que la represión catabólica mediada por este regulador podría diferir según las células crezcan a 10° C o a 30°C. Para analizar la funcionalidad del regulador Crc a bajas temperaturas, analizamos la expresión a 10°C de los genes de dos rutas catabólicas de *P. putida* cuya expresión está directamente regulada por Crc cuando las células crecen en LB a 30°C. Una de ellas es la ruta de degradación de alcanos codificada en el plásmido OCT; la otra es la ruta cromosómica de degradación de benzoato (102, 133, 165, 167).

7.3.2.1 Regulación de la ruta de degradación de alcanos a 10°C

La expresión de los genes de la ruta de degradación de alcanos codificada en el plásmido OCT se induce en presencia de alcanos, pero esta inducción está fuertemente reprimida por represión catabólica cuando las células crecen exponencialmente en medio LB a 30°C (165). Una parte de esta inhibición está mediada por Crc (167), aunque otros factores, como el sistema de Cyo, también ejercen un claro efecto represor (42). El efecto represor de estos dos sistemas está dirigido, fundamentalmente, a inhibir la síntesis de la proteína AlkS, un regulador que activa la transcripción de todos los genes de la ruta OCT cuando hay alcanos en el medio. Para analizar si esta represión catabólica se mantiene cuando las células crecen a 10°, utilizamos las cepas indicadoras *P. putida* PBS4 y PBS4C1 (165, 167). Estas cepas contienen en su cromosoma una fusión transcripcional del promotor del gen *alkB* con el gen *lacZ* (fusión *PalkB::lacZ*), y el gen *alkS*, que codifica para el regulador de transcripción AlkS que activa el promotor *PalkB* en presencia de alcanos. La cepa PBS4C1 es isogénica con PBS4 pero lleva inactivado el gen *crc*.

Cuando medimos la actividad de la fusión *PalkB::lacZ* en ambas cepas creciendo exponencialmente en LB con el inductor DCPK (que emula la acción inductora de los alcanos) a 10°C, observamos que la expresión de *alkB* en la cepa silvestre (PBS4) seguía estando tan reprimida como a 30°C (Figura 23). En ambos casos, y tal y como se ha descrito anteriormente (165,

167), la represión desapareció cuando las células entraron en la fase estacionaria de crecimiento. En la cepa carente del gen *crc* se observó una disminución de la represión catabólica sobre esta ruta, de magnitud similar a la que ocurre a 30°C. Por lo tanto, parece que a 10°C, la represión catabólica mediada por Crc sobre la ruta de degradación de alcanos no se ve afectada por la temperatura.

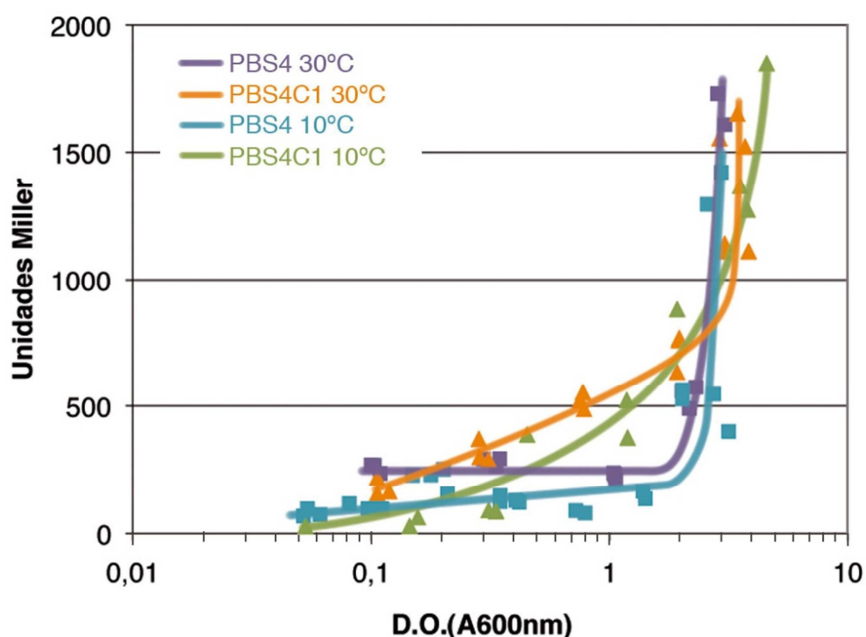


Figura 23. Efecto de las bajas temperaturas en la actividad del promotor *PalkB* en las cepas PBS4 y PBS4C1 (isogénica con PBS4, pero con el gen *crc* inactivado), creciendo en medio rico LB en presencia del inductor no metabolizable DCPK. A lo largo del crecimiento se tomaron alícuotas de los cultivos y se midió la actividad β -galactosidasa. PBS4 a 30°C: morado; PBS4C1 a 30°C: naranja; PBS4 a 10°C: azul; PBS4C1 a 10°C: verde.

7.3.2.2 Regulación de la ruta de degradación de benzoato a baja temperatura

La inducción de los genes de la ruta de degradación de benzoato de *P. putida* también está inhibida por represión catabólica cuando las células crecen exponencialmente en medio LB a 30°C (102). En este caso, la represión depende exclusivamente del regulador Crc. Igual que en el caso anterior, para analizar si esta represión catabólica se mantiene cuando las

células crecen a 10°C, utilizamos las cepas indicadoras *P. putida* PBA1 y PBA1C (102). Estas cepas contienen en su cromosoma una fusión transcripcional del promotor del gen *benA* con el gen *lacZ* (fusión *PbenA::lacZ*), y el gen *benR*, que codifica para el regulador de transcripción BenR, que activa el promotor *PbenA* en presencia de benzoato. La cepa PBA1C es isogénica con PBA1, pero lleva inactivado el gen *crc*.

Como se muestra en la Figura 24, la expresión del promotor *PbenA* es muy baja en células creciendo en LB a 30°C en presencia de benzoato, pero aumenta mucho cuando se inactiva el gen *crc*. Al realizar el mismo ensayo en células creciendo a 10°C, se observa que el efecto represor de Crc desaparece parcialmente en la cepa que contiene el gen *crc*. Este resultado, junto con los datos aportados por los ensayos de transcriptómica y proteómica de células creciendo a bajas temperaturas, parecen indicar que la actividad represora de Crc puede estar comprometida a bajas temperaturas en algunos genes, aunque no en todos.

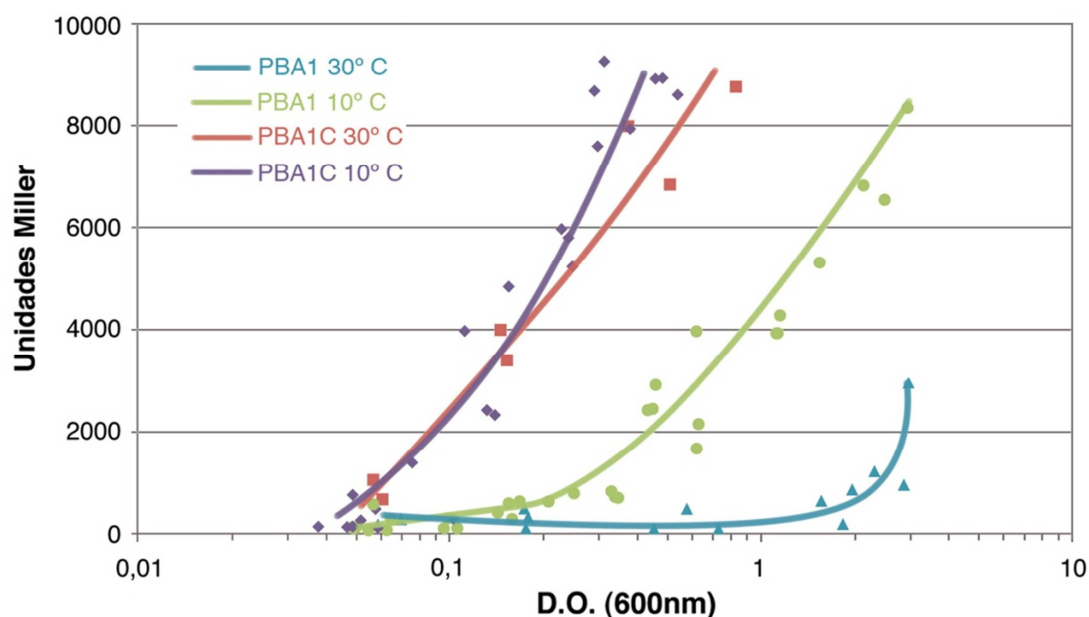


Figura 24. Actividad del promotor *PbenA* en células creciendo en medio LB en presencia de benzoato (5 mM), y a 10°C o a 30°C. La cepa PBA1 contiene un alelo silvestre de Crc, mientras que PBAC1 tiene el gen *crc* inactivado. La actividad del promotor *PbenA* se midió siguiendo la actividad β -galactosidasa a lo largo del crecimiento, gracias a la fusión transcripcional del gen *PbenA::lacZ*. PBA1 a 30°C: azul; PBA1 a 10°C: verde; PBA1C a 30°C: rojo; PBA1C a 10°C morado.

7.3.3 Análisis transcriptómico del efecto del regulador Crc en células creciendo a 10°C

Para obtener una visión global del funcionamiento del regulador Crc cuando las células crecen a baja temperatura, comparamos el transcriptoma de *P. putida* KT2440 con el de su cepa isogénica KTCRC, en la que el gen *crc* está inactivado, en células creciendo exponencialmente (OD = 0,6) en medio LB a 10°C, utilizando un *microarray* genómico para esta bacteria. Los resultados mostraron que, en esas condiciones, inactivar el gen *crc* lleva a que se expresen diferencialmente un total de 58 genes (cambio mayor de dos veces, $P < 0,05$ corregido por FDR). En 10 de estos genes los niveles de ARNm fueron mayores en ausencia de Crc, mientras que en otros 48 genes estos niveles disminuyeron (Tabla 15). Para verificar estos datos, se midieron

los niveles de ARNm en cinco genes seleccionados mediante RT-PCR en tiempo real. Los resultados (Tabla 8) fueron cualitativamente similares a los obtenidos con los *microarrays*.

Estos datos difieren con los obtenidos a 30° C en el mismo medio, que muestran que cambian los niveles de ARNm de 92 genes al inactivar *crc* (estudio de Moreno et al. 2009 (100)). Por tanto, estos resultados parecen confirmar que la represión mediada por Crc es menor o afecta a menos genes, cuando las células crecen a 10°C.

Tabla 8. Cambio en los niveles de ARNm de los genes indicados en la cepa KTCRC respecto a la cepa silvestre KT2440, en células creciendo exponencialmente en medio LB a 10°C. La columna izquierda muestra los resultados obtenidos mediante RT-PCR en tiempo real, y la derecha mediante *microarrays*. Para la RT-PCR en tiempo real, se utilizó el gen *rpoN* como control interno.

Gen	RT-PCR en tiempo real	Microarrays
	Cambio (nº de veces \pm ESM)	Cambio (nº de veces)
PP_0882	-3,6 \pm 0,3	- 2,9
PP_0883	-3,5 \pm 0,3	-3,1
PP_2335	-5,7 \pm 0,2	-5,5
PP_2336	-6,2 \pm 0,7	-5,3
PP_3754	-9,1 \pm 1	-5,5

7.3.4 Posibles causas de la disminución de la represión catabólica a baja temperatura

Teniendo en cuenta el mecanismo y regulación de Crc, la menor actividad represora que parece tener esta proteína a bajas temperaturas podría deberse a diversas causas:

- Los niveles de ARNm del gen *crc* podrían ser menores a 10°C que a 30°C.
- Los niveles de proteína Crc podrían ser menores a 10°C que a 30°C.
- Los niveles del ARN pequeño CrcZ podrían ser mayores a 10°C que a 30°C, de forma que hubiese menos proteína Crc disponible.

- En algunos ARNm, las dianas de Crc podrían ser menos accesibles a 10°C que a 30°C por estar en conformación de doble cadena.
- Combinación de varios de los factores anteriores.

Algunas de estas posibilidades se analizan en los apartados siguientes.

7.3.4.1 Niveles de ARN mensajero de *crc* a baja temperatura

Los niveles de ARNm del gen *crc* en células creciendo exponencialmente ($A_{600} = 0,6$) en medio LB a 10°C o a 30°C se midieron mediante RT-PCR en tiempo real, utilizando el gen *rpoN* como control interno. Los niveles de ARNm del gen *crc* apenas disminuyeron al disminuir la temperatura ($-1,7 \pm 0,1$ veces). Por lo tanto, parece que puede descartarse que la menor actividad represora de Crc a 10°C se deba a la disminución en los niveles de ARN mensajero de *crc* en estas condiciones.

7.3.4.2 Niveles de la proteína Crc a 10°C

Los niveles de proteína Crc presente en la cepa KT2440 creciendo exponencialmente en LB a 10°C y a 30°C se analizaron mediante ensayos de *Western blot*. El ensayo se hizo sobre un extracto celular obtenido tras romper las células por sonicación y eliminar el material insoluble por centrifugación. Las proteínas de este extracto se separaron en un gel de poliacrilamida con SDS y, posteriormente, se transfirieron a una membrana de PVDF. Se incluyeron, además, controles con proteína purificada Crc y con extracto celular de una cepa deficiente en el gen *crc*. La presencia de la proteína Crc se determinó mediante un anticuerpo policlonal anti-Crc (133). Como puede verse en la Figura 25, los niveles de Crc fueron muy similares a 30°C y a 10°C, por lo que puede afirmarse que la liberación parcial de la represión catabólica mediada por Crc a 10°C no se debe a una disminución en los niveles de esta proteína.

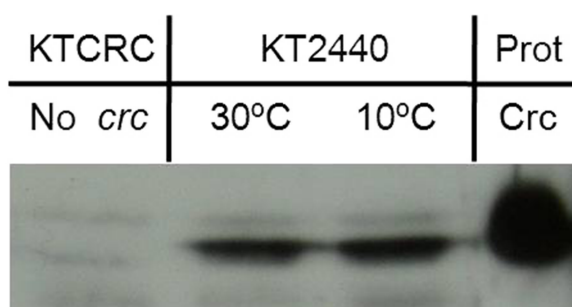


Figura 25. Niveles de la proteína Crc en células creciendo exponencialmente en medio LB a 30°C o a 10°C, medidos con un anticuerpo anti-Crc. El carril de la izquierda corresponde a extracto celular de la cepa carente del gen *crc* (KTCRC), y en el carril de la derecha a proteína Crc purificada. Los dos carriles centrales corresponden a extracto de la cepa KT2440 crecida a 30°C, o a 10°C.

7.3.4.3 El RNA pequeño *CrcZ* en *P. putida*: expresión en diferentes condiciones de cultivo

Como ya se ha comentado en la introducción, en *P. aeruginosa* se ha descrito recientemente la existencia de un ARN pequeño capaz de secuestrar Crc, liberando de esta forma la represión catabólica al haber menos Crc disponible (140). La existencia de este RNA pequeño no se había demostrado en *P. putida*. Por lo tanto, el primer paso fue buscarlo en la misma región intergénica en la que se había encontrado en *P. aeruginosa*, es decir, entre los genes *cbrB* y *pcnB*. Al comparar ambas regiones, comprobamos que eran bastante similares y que *CrcZ* podría estar presente también en *P. putida* (Figura 26).

CRCZ_Pa	1	-----GCAC AACAACAATAACAAG CA--ACGACGAAGAC AATAAAAAACAA	43
		
CRCZ_Pp	1	GTTTGGTAC AAGAACAATAACAAG CACTGCAACTCAG-- AATAAGAACAA	48
CRCZ_Pa	44	CACGTAACGACTCCAGC ACAACAAAAACAAAA TCGCGGAGGCGCAGCTAA	93
		
CRCZ_Pp	49	GACGAAACGGCTCACGC ACAATAAAAAACAAGA TGGCGGAGGCGCAGCTAA	98
CRCZ_Pa	94	CTGATTCTTTTGGAGAGGAGTTGC-TG-TCGGGACCCGTCCCGCAGCCAG	141
		
CRCZ_Pp	99	CTGATTCTTTTGGAGAGGA--TGCCTGTTTGGGGCTTGCCCCACAACCAG	146
CRCZ_Pa	142	TCG GAGAAGAATAAAAC TGC-CTTGAGGCAGCGCACAGACTGGTTGGAT	190
		
CRCZ_Pp	147	GCA GAGAACAACAAAAAC TGCACTAAAAGCAGCGCCTGAACTGGTTGGA-	195
CRCZ_Pa	191	CGCTCGAC-GATCATGGCAGCATCAGCGACCAAAGCAATCCGTTTGCTAT	239
		
CRCZ_Pp	196	---TCGACAGATCAACGTGACATCAGCGCCAAAGCAATCCGTTTGCTCT	242
CRCZ_Pa	240	TGAACCTCCAGCCTGGGAGATATCCCTGAAGCGACTGGCTCAAGGGACGG	289
		
CRCZ_Pp	243	T-TACCCCCGTTTGGGGGTGTCACAC-AAGCTTCGAGATTGTGGACAG	290
CRCZ_Pa	290	GTCGACA AACAAAAACAACAAG CCCGAAAT CATAATAAAAAACAA -AGCAC	338
		
CRCZ_Pp	291	GGCAC TAAACAAAAACAAGAAG CCC---AG CAAAAAACAATAA GAGCAC	337
CRCZ_Pa	339	GCACCTACTTGGGGGGGAGCTTCCGCTCCCCCAGTAGCTTACCCCCCTC-	387
		
CRCZ_Pp	338	GCAACGACTTCTTGGGGAGCTTAGGCTCCCCTTGTCTTTCTACCTTCT	387
CRCZ_Pa	388	-----CCT-----CCG-----TTTTCCTCGTTTTT-	407
		
CRCZ_Pp	388	GGCAGGCATCCTGCTACCCGCCTACACCATCCCCGAGTAAA	429

El siguiente paso consistió en confirmar la expresión transcripcional de este RNA e investigar si sus niveles de expresión están correlacionados con los niveles de represión catabólica que se observan en diferentes condiciones de cultivo. Para ello, medimos por RT-PCR en tiempo real los niveles de *CrcZ* de células crecidas en las siguientes condiciones:

- Células creciendo exponencialmente en medio LB a 30°C.
- Células en fase estacionaria en medio LB a 30°C
- Células creciendo exponencialmente en medio LB a 10°C.
- Células creciendo exponencialmente en medio mínimo con citrato como fuente de carbono, a 30°C.
- Células creciendo exponencialmente en medio mínimo con succinato como fuente de carbono, a 30°C.

La Figura 27 muestra los resultados obtenidos, referidos a la condición en la que hay mayor represión catabólica, es decir, en células creciendo exponencialmente en medio LB a 30°C. Parece claro que los niveles de CrcZ varían significativamente según las condiciones de cultivo. En el caso de células creciendo en medio LB, los niveles de CrcZ son 20 veces mayores cuando las células llegan a fase estacionaria que cuando crecen exponencialmente. Hay que recordar que, en fase estacionaria, la actividad de Crc desaparece. De igual forma, si la temperatura de crecimiento se disminuye hasta los 10°C, condición en la que el efecto de Crc es menor, los niveles de CrcZ en células creciendo exponencialmente en medio LB aumentan 2-3 veces. Finalmente, en células creciendo exponencialmente en medio mínimo utilizando citrato o succinato como fuente de carbono, dos condiciones en las que no hay represión catabólica mediada por Crc, los niveles de CrcZ aumentaron, respectivamente, 4 y 8 veces. Esto sugiere que hay una relación inversa entre la cantidad de CrcZ y la fortaleza de la represión catabólica: cuanto más CrcZ, menor represión catabólica. En apoyo de esta idea, la Figura 28 muestra el nivel de inducción del promotor *PbenA* de la ruta de degradación del benzoato de *P. putida* en las mismas condiciones de crecimiento en las que se analizaron los niveles de CrcZ; la represión catabólica de esta ruta degradativa depende solamente de la proteína Crc. Para facilitar la comparación de los niveles de inducción de *PbenA* con los de CrcZ, en la parte B de la figura 24 se muestran los niveles de inducción referidos a los observados en la condición en la que hay mayor represión catabólica mediada por Crc (crecimiento exponencial en LB a 30°C). Como puede observarse, hay una correlación inversa entre los niveles de CrcZ y la fortaleza de la represión catabólica, de forma que cuando hay más CrcZ la represión es menor.

Resultados

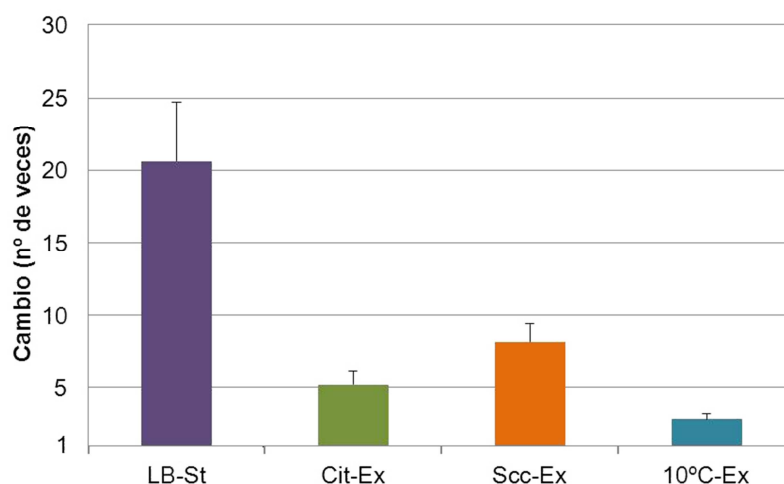
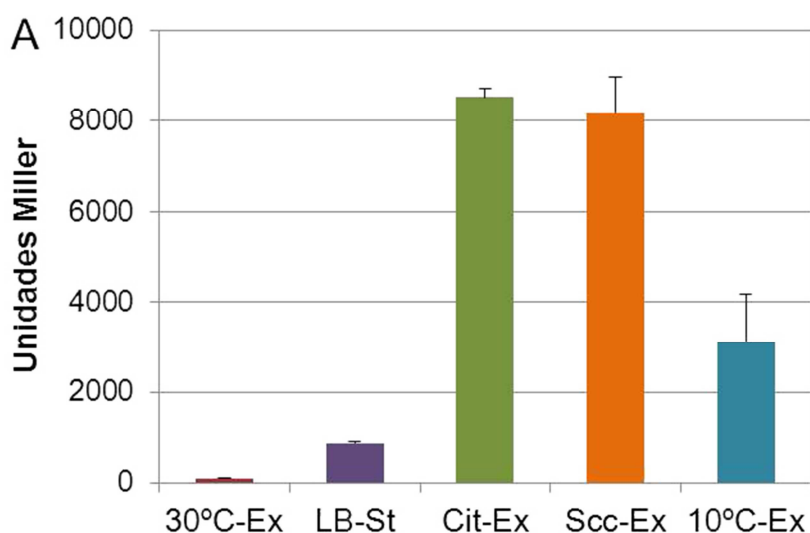


Figura 27. Niveles de CrcZ en *P. putida* KT2440 creciendo en diferentes condiciones, medidos por RT-PCR en tiempo real. Los resultados se muestran referidos a los niveles observados en células creciendo exponencialmente ($A_{600nm}=0,6$) en medio LB a 30°C. Las condiciones analizadas fueron: medio LB a 30°C en fase estacionaria ($A_{600nm} = 3$; LB-St), crecimiento exponencial ($A_{600nm}=0,6$) en medio mínimo utilizando como fuente de carbono citrato 30 mM (Cit-Ex) como fuente de carbono; medio mínimo con succinato 30 mM (Scc-Ex) como fuente de carbono, o medio LB a 10°C (10°C-Ex).



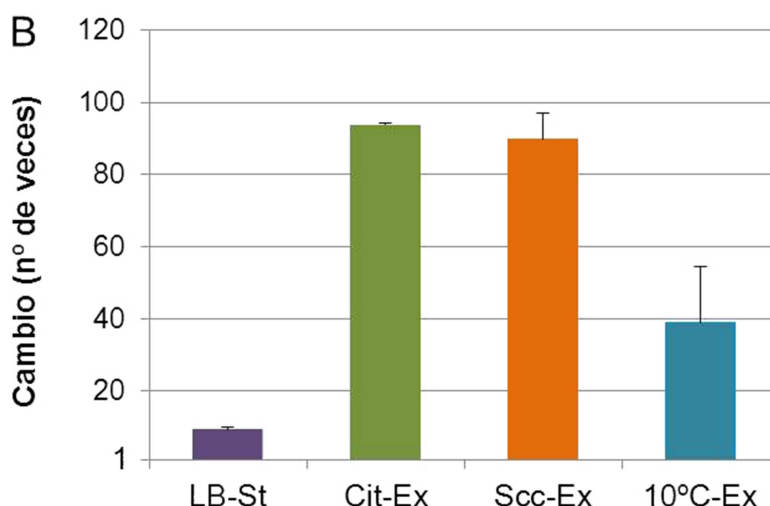


Figura 28. Inducción de la fusión transcripcional *PbenA::lacZ* de la cepa *P. putida* PBA1 en células creciendo en diferentes condiciones. Las células se inocularon en los medios indicados más adelante a una turbidez (A_{600}) de 0.05, en presencia de benzoato sódico 5 mM, y se incubaron a 30°C o a 10°C con agitación. A diferentes tiempos se tomaron muestras para medir la actividad β -galactosidasa. (A) Se muestran los niveles de β -galactosidasa observados en cada condición cuando los cultivos llegaron a una turbidez de 0,6 (fase exponencial), o de 3,0 (fase estacionaria). Las condiciones analizadas fueron: medio LB a 30°C en fase exponencial (30°C-Ex), medio LB a 30°C en fase estacionaria (LB-St), crecimiento exponencial ($A_{600} = 0,6$) en medio mínimo utilizando como fuente de carbono citrato 30 mM (Cit-Ex) o succinato 30 mM (Scc-Ex), o en medio LB a 10°C (10°C-Ex). (B) Niveles de inducción referidos a la inducción observada en células creciendo exponencialmente en medio LB a 30°C (valor de referencia).

7.3.4.4 La expresión de *CrcZ* depende del regulador de respuesta *CbrB*

En *P. putida*, al igual que en *P. aeruginosa*, el sistema de dos componentes *CbrA/CbrB* está localizado corriente arriba del gen *crcZ*. En *P. aeruginosa*, el regulador de respuesta *CbrB* es un activador transcripcional de *CrcZ* (140). Por lo tanto, analizamos la expresión del gen *crcZ* en un mutante en el gen *cbrB*. Para ello utilizamos la técnica de RT-PCR en tiempo real en muestras obtenidas de la cepa silvestre (KT2442) y de una cepa derivada de KT2442 con el gen *cbrB* deletado (MPO401). Como puede observarse en la Tabla 9, en ausencia de *CbrB* los valores de expresión de *CrcZ* son entre 15 y 22 veces menores que en la cepa silvestre en todas las condiciones analizadas. Estos resultados indican que la expresión de *CrcZ* en *P. putida*, al igual que en *P. aeruginosa* (140), depende de *CbrB*.

Tabla 9. Niveles de expresión de CrcZ en la cepa deficiente en el gen *cbrB* respecto a la silvestre en diferentes condiciones. Resultados obtenidos por RT-PCR en tiempo real. MM: medio mínimo. Para facilitar la comprensión, se muestra el inverso del cociente, con signo negativo.

Condición de crecimiento	Relación ARN de CrcZ en <i>cbrB</i> ⁻ vs silvestre
LB Exponencial 30°C	-17,2 ± 2,3
LB Exponencial 10°C	-22,0 ± 1,6
LB Estacionaria 30°C	-15,6 ± 0,9
MM + Succinato	- 21,4 ± 1,4

7.3.5 Inactivación del RNA pequeño CrcZ y su efecto en represión catabólica.

Si el ARN pequeño CrcZ se une a Crc y lo secuestra, impidiendo así que Crc se una a sus dianas en los ARN mensajeros que reprime, sería de esperar que si no hay CrcZ, haya más Crc disponible para unirse a sus dianas, lo que aumentaría su efecto represor, como sucede en *P. aeruginosa* (140). Para comprobar esta hipótesis, se inactivó el RNA CrcZ en las cepas KT2440 y PBA1, delecionándolo y sustituyéndolo por un gen de resistencia a tetraciclina mediante intercambio alélico. Las cepas resultantes se denominaron KTCRCZ y PBA1Z. Se comprobó que CrcZ no estaba produciéndose en las cepas mutantes mediante RT-PCR en tiempo real.

Para analizar el efecto que podía tener la ausencia de CrcZ en represión catabólica, se analizó la expresión de la ruta de degradación de benzoato en células creciendo en LB a 10°C y a 30°C. Como puede observarse en la Figura 29, la ausencia de CrcZ no da lugar a un fenotipo de hiperrepresión, ni sobre la ruta de degradación del benzoato, ni a 10°C ni a 30°C. En células creciendo exponencialmente en medio LB a 30°C podría pensarse que las cantidades de Crc disponibles son todo lo elevadas que pueden ser. Sin embargo, dado que a 10°C los niveles de CrcZ en la cepa silvestre son mayores que a 30°C, aunque los niveles totales de Crc total se mantienen, es de esperar que al eliminar CrcZ aumente la represión a 10°C. Sin embargo este fenotipo no se observa.

Por lo tanto, como alternativa para estudiar el fenotipo de la delección de *CrcZ*, pasamos a estudiar otros genes regulados por *Crc*. Elegimos los genes del operón *bkd* (*bkdA1A2B-lpdV*), que están implicados en la ruta de asimilación de aminoácidos ramificados. Estos aminoácidos no son sustratos de utilización preferente, y en medio LB a 30°C su expresión está inhibida por *Crc* (67, 100). La inducción de los genes *bkd* requiere del activador de transcripción *BkdR*, cuya expresión está controlada directamente por *Crc* (67). Los niveles de ARNm correspondientes a *bkdA1* en la cepa silvestre KT2440 creciendo en medio LB son 29 veces mayores a 10°C que a 30°C (Figura 30). Sin embargo, en la cepa que carece de *crcZ* (KTCRCZ), los niveles a 10°C son sólo 10 veces mayores que a 30°C, es decir, el aumento es tres veces menor. Esto sugiere que, al eliminar *CrcZ*, los niveles efectivos de *Crc* a 10°C aumentan.

Una posibilidad que había que comprobar era si los niveles de expresión del gen *crc* se veían afectados en las cepas que carecían del ARN *CrcZ*. Para ello, analizamos por RT-PCR en tiempo real los niveles de expresión del gen *crc* en la cepa KT2440 y KTCRCZ en medio LB a 10°C y a 30°C. Los resultados obtenidos muestran que los niveles de ARNm de *crc* apenas varían al delecionar *CrcZ*, y son similares a 10°C y a 30°C (Tabla 10).

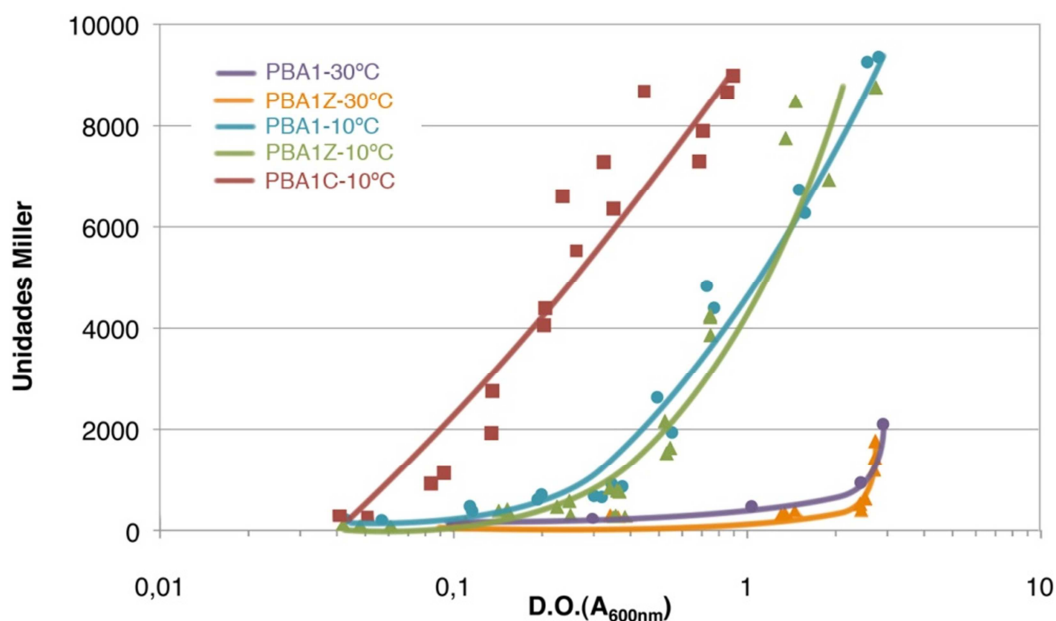


Figura 29. Actividad del promotor *PbenA* en medio LB a 30° C y a 10° C en las cepas PBA1 (silvestre), PBA1Z (deriva de PBA1 pero carece del ARN pequeño CrcZ) y PBA1C (deriva de PBA1 pero carece del regulador Crc). La actividad del promotor *PbenA* se determinó midiendo los niveles de β -galactosidasa generada a partir de la fusión transcripcional *PbenA::lacZ*. PBA1 a 30°C: morado; PBA1Z a 30°C: naranja; PBA1 a 10°C: azul; PBA1Z a 10°C: verde; PBA1C a 10°C: rojo.

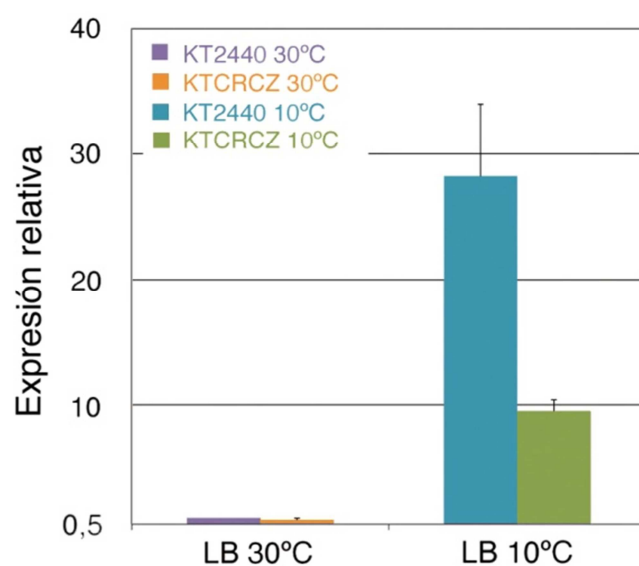


Figura 30. Niveles de ARN mensajero del gen *bkdA1* en células creciendo en medio LB a 10° C (columnas de la derecha) respecto a células creciendo a 30° C (columnas de la izquierda), tanto en la cepa deficiente en *crcZ* (KTCRCZ) como en la silvestre (KT2440). Los datos se obtuvieron mediante RT-PCR en tiempo real. En todos los casos, los niveles de mRNA están referidos a los observados para KT2440 en LB a 30° C. KT2440 a 30°C: morado; KTCRCZ a 30°C: naranja; KT2440 a 10°C: azul; KTCRCZ a 10°C verde.

Tabla 10. Niveles del ARNm del gen *crc* en las cepas KT2440 y KTCRCZ crecidas en medio LB a 30°C, o a 10°C, medidos por RT-PCR en tiempo real. Los datos están indicados tomando como referencia los niveles observados para KT2440 creciendo exponencialmente en LB a 30°C.

Cepa	ARNm de <i>crc</i> (referido a KT2440 a 30°C)	
	30°C	10°C
KT2440	1	-1,3 ± 0,2
KTCRCZ	1,3 ± 0,1	-1,5 ± 0,1

7.3.6 La sobreexpresión de CrcZ libera la represión catabólica existente en la ruta de benzoato a 30°C y a 10°C

Si el ARN pequeño CrcZ se une a Crc impidiendo que bloquee la traducción de los ARN mensajeros que contiene dianas, es de esperar que la sobreexpresión de CrcZ reduzca o elimine la represión catabólica ejercida por Crc. Para comprobar esta hipótesis, sobreexpresamos CrcZ en un plásmido de expresión (pSEVA424) dependiente del promotor *P_{trc}* en la cepa PBA1. Cuando analizamos la actividad del promotor *P_{benA}* en células creciendo en medio LB con el plásmido pCRCZ (plásmido pSEVA424 con *crcZ*), o con el plásmido sin inserto (pSEVA424), en ambos casos en presencia de IPTG (para inducir la expresión de CrcZ desde *P_{trc}*) y benzoato (Figura 31), observamos que al sobreexpresar CrcZ se libera la represión catabólica sobre esta ruta de degradación, tanto a 30°C como a 10°C.

Para verificar que CrcZ se estaba sobreproduciendo, cuantificamos los niveles de CrcZ por RT-PCR en tiempo real cuando en las cepas anteriores (Tabla 11). Los niveles de CrcZ a 30°C detectados fueron unas cinco veces mayores en la cepa que contiene el plásmido pCRCZ que en la que contiene el vector pSEVA424 sin inserto. A 10°C, la sobreproducción de CrcZ fue de

Resultados

unas tres veces y media mayor. Por lo tanto, la inducción de *PbenA* parece estar directamente provocada por el aumento en los niveles de CrcZ.

A la vista de estos resultados, parece confirmarse que CrcZ es capaz de secuestrar Crc en *P. putida* aliviando la represión catabólica.

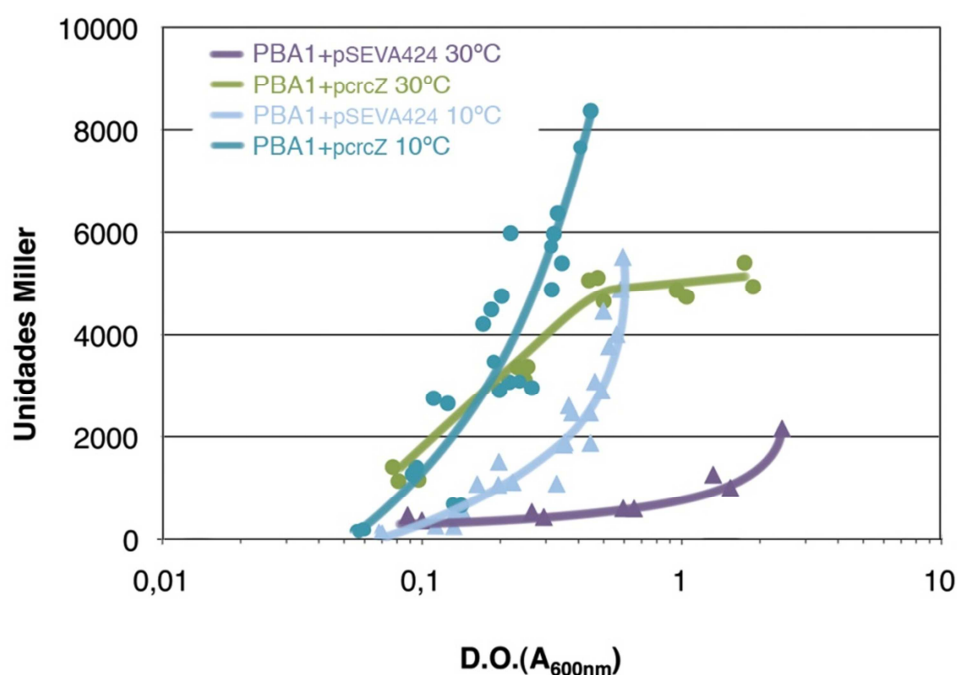


Figura 31. Efecto de sobreexpresar CrcZ en la expresión de la fusión *PbenA::lacZ* en células creciendo en medio LB a 30°C y a 10°C. La expresión de la copia de CrcZ presente en el plásmido pCRCZ se indujo añadiendo IPTG 1 mM al medio de cultivo. El efecto del plásmido pSEVA424, el vector original en el que se clonó CrcZ, se analizó en paralelo como control. PBA1 + pSEVA424 a 30°C: morado; PBA1 + pcrCZ a 30°C: verde; PBA1 + pSEVA424 a 10°C: azul claro; PBA1 + pcrCZ a 10°C: azul oscuro.

Tabla 11. Niveles del ARN CrcZ cuando se sobreexpresa en *trans* desde el plásmido pCRCZ en la cepa PBA1, medidos por RT-PCR en tiempo real. Los niveles de CrcZ están referidos a los observados en la cepa que lleva el plásmido sin el inserto (pSEVA424), crecida a la temperatura indicada. Para inducir la expresión de CrcZ desde pCRCZ, se añadió IPTG hasta una concentración final de 1 mM.

Cepas	CrcZ (inducción, nº de veces)	Desviación Estándar
PBA1 + pCRCZ, 30°C	5,3	0,5
PBA1 + pCRCZ, 10°C	3,5	0,5

8 DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La represión catabólica es un fenómeno de regulación global de la expresión génica que permite coordinar el metabolismo de fuentes de carbono, optimizando el crecimiento en función de los recursos disponibles y facilitando por tanto la competitividad de la bacteria en el ambiente en el que vive y crece. Entender los mecanismos moleculares por los que ocurre este fenómeno es importante no sólo para comprender cómo asimilan las bacterias las fuentes de carbono en la Naturaleza, sino para optimizar procesos biotecnológicos como procesos de biorremediación o de biotransformaciones. Los mecanismos de represión catabólica son diferentes en distintas especies microbianas. En el caso de las bacterias del género *Pseudomonas*, que son muy importantes en biotecnología, en medicina y en el mantenimiento del medio ambiente, los mecanismos de represión catabólica se conocen muy mal. En esta tesis se ha intentado identificar y caracterizar nuevos factores implicados en el fenómeno de represión catabólica en *P. putida*, explorando aspectos que rara vez se han estudiado en otras bacterias modelo.

8.1 Función de la RNasa R en *P. putida* y su posible implicación en represión catabólica

A raíz del trabajo publicado por Hester et al. en el 2000 (67), en el que se observó que una cepa mutante en el gen *rnr* de *P. putida* presentaba una menor represión catabólica sobre la ruta de degradación de aminoácidos ramificados, decidimos investigar la posible función de la RNasa R en represión catabólica. El modelo elegido para ello fue la ruta de degradación de alcanos del plásmido OCT de *P. putida*. La actividad del promotor de los genes estructurales de esta ruta (*PalkB*) está fuertemente reprimida por represión catabólica cuando las células crecen exponencialmente en medio LB a 30°C, efecto que depende fundamentalmente de la proteína Crc y de la oxidasa terminal Cyo (42, 167). Sin embargo, la inactivación del gen que codifica para la RNasa R no disminuyó este efecto represor. Esto indica que la RNasa R no parece estar implicada en la represión catabólica ejercida sobre esta ruta metabólica en medio rico en las condiciones analizadas. Es posible que la mayor expresión del gen *bkdR* en la cepa carente del gen *rnr* descrita por Hester et al. (67) se deba a una mayor estabilidad del transcrito

bkdR cuando la RNasa R está ausente, y no a un efecto directo de este enzima en represión catabólica.

El que la RNasa R no ejerza ninguna influencia sobre la represión catabólica de la ruta de degradación de alcanos no significa, sin embargo, que no pueda estar implicada en la represión catabólica de otros genes. Para explorar esta posibilidad, analizamos el efecto de la ausencia de la RNasa R en el conjunto del transcriptoma de la célula en condiciones en las que la represión catabólica es máxima, es decir, en células creciendo exponencialmente en medio rico LB a 30°C. Este análisis nos sirvió, además, para estudiar la función de este enzima en el procesamiento de ARNs mensajeros de la célula, aspecto interesante del que apenas se sabía nada. La RNasa R es una exorribonucleasa muy procesiva cuya característica principal es su capacidad de degradar ARNs con mucha estructura secundaria (155). De hecho, en *E. coli* la RNasa R realiza parte del control de calidad de los ARNs ribosomales 23S y 16S (28) y en *P. syringae* procesa los extremos 3' de los ARNs 16S y 5S (123). Sin embargo, la importancia de la RNasa R en la degradación de ARN mensajero era bastante desconocida al iniciarse este trabajo. Se sabía que, junto con la PNPasa, degrada ARNs mensajeros con secuencias REP y se conocían algunos casos en los que la RNasa R degradaba de forma específica algunos ARN mensajeros concretos, como el sistema de tmARN (20, 69, 79, 128), *ompA* (4) o *rpsO* (5).

La inactivación del gen que codifica para la RNasa R no afecta a la velocidad de crecimiento de *P. putida* en medio rico LB a 30°C. Sin embargo, al comparar el transcriptoma de la cepa *P. putida* KTRNR1, desprovista de la RNasa R, con el de la cepa silvestre KT2440, en células creciendo exponencialmente en este medio a 30°C, observamos que la ausencia de la RNasa R altera los niveles de un gran número de genes. Este resultado apoya la idea de que la RNasa R posee un papel clave en la degradación de ARNm. De hecho, estos datos indican que su ausencia no puede ser completamente suplida por otras nucleasas ni siquiera en condiciones en las que la carencia RNasa R parece no afectar al crecimiento celular. Además, dado que los *microarrays* tienen una sensibilidad limitada y que se aplican filtros estadísticos estrictos para evitar falsos positivos, los resultados de transcriptómica probablemente estén subestimando el número total de genes que realmente ven afectada su expresión. De cinco genes elegidos para la validación de los resultados del análisis transcriptómico que no mostraban diferencias significativas, uno mostró cambios al analizar sus niveles por RT-PCR en tiempo real.

En cualquier caso, al observar los genes cuya expresión cambia al inactivar la RNasa R no se aprecia un efecto claro en la liberación de la represión catabólica que sabemos que afecta a diversas rutas catabólicas de aminoácidos y azúcares cuando las células crecen en las condiciones analizadas. En particular, no se aprecia liberación de la represión que afecta a los genes de transporte y asimilación de aminoácidos ramificados, en contra de lo que se había descrito (67). Aunque esto pueda deberse, al menos en parte, a que el *microarray* no tenga la sensibilidad suficiente para detectar cambios pequeños en los niveles de ARNm, sí parece claro que la ausencia de la RNasa R no tiene un efecto notorio sobre la represión catabólica que afecta a rutas de asimilación de aminoácidos y azúcares en medio LB. Por otra parte, al comparar el efecto que produce en el transcriptoma de la célula el inactivar el gen *crc* (100), el gen *cyoB* (98) o el gen *mnr* (este trabajo), en células creciendo a 30°C en un medio rico como el LB que induce un fuerte efecto de represión catabólica, se observa que apenas hay genes cuya expresión dependa de forma conjunta por Crc y la RNasa R, o por Cyo y la RNasa R. Eso quiere decir que se trata de sistemas reguladores que afectan a grupos de genes muy diferentes. En otras palabras, no parece que la RNasa R tenga una función importante en represión catabólica en las condiciones analizadas.

Por otro lado, confirmamos que algunos de los genes cuyos niveles aumentaron con la ausencia de la RNasa R eran dianas directas de esta RNasa. Probablemente, los ARNs mensajeros de estos genes posean mucha estructura secundaria, lo que dificulta su degradación por otras exorribonucleasas (9, 155). Cuando analizamos si la ausencia de la RNasa R se compensaba con modificaciones en otros componentes implicados en el procesamiento de RNAs, sólo observamos el aumento del ARNm de dos de las cuatro ARN helicasas analizadas: *rhIB* y *rhIE*. Este aumento fue, además, muy discreto. Por lo tanto, cabe pensar que el aumento en la expresión de las ARN-helicasas y de otras nucleasas no es suficiente para hacerse cargo de la gran cantidad de ARNs mensajeros cuya degradación parece depender principalmente de la RNasa R. El aumento en la estabilidad de algunos ARNm derivado de la ausencia de la RNasa R podría, además, estar provocando efectos indirectos sobre la expresión de otros genes.

La gran procesividad de la RNasa R sobre RNAs con una elevada estructura secundaria hace esperar que este tipo de ARNs sean dianas preferentes para esta nucleasa. Los genomas de muchas especies bacterianas, entre ellos el de *P. putida*, contienen unos elementos de 35-40 pb repetidos y palindrómicos, llamados secuencias REP, que están

localizados en su mayoría en zonas intergénicas (7). Su función no está clara, pero muchas secuencias REP están en regiones que se transcriben de forma activa. Los mRNAs que estén asociados a una secuencia REP tendrán, por lo tanto, una elevada estructura secundaria en esta zona. En *E. coli*, se ha descrito que la RNasa R es particularmente activa frente a ARNs que contienen secuencias REP y se ha propuesto que esta RNasa juega un papel importante en la degradación de estos ARNs (26). *P. putida* KT2440 contiene en su genoma un total de 938 secuencias REP (7, 148) y 5420 genes anotados (108), lo que significa que de media se pueden asociar un 17% de los genes con una secuencia REP. Entre los genes cuyos niveles de ARNm se modificaba al inactivar la RNasa R, sólo 22 poseen secuencias REP corriente abajo o en la secuencia codificante. Esto supone un porcentaje del 11%, que es similar o incluso menor que el del genoma completo. Por lo tanto, la RNasa R no parece especializada en procesar ARNs con secuencias REP. Este resultado es coherente con el hecho de que, en *E. coli*, sólo se acumulan ARNs con secuencias REP cuando están ausentes tanto la RNasa R como la PNPasa, pero no cuando sólo falta la RNasa R (26).

Los terminadores intrínsecos de la transcripción incluyen una región con simetría invertida capaz de formar estructuras secundarias (112). Aunque no se ha descrito que la degradación de estas estructuras esté asociada a la RNasa R, podrían ser un sustrato preferente para ella debido a su estructura secundaria. Las predicciones informáticas han permitido identificar un terminador de la transcripción de este tipo en al menos un 9% de los genes de *P. putida* KT2440 (<http://www.tigr.org>). Sin embargo, sólo un 8,6 % de los mRNAs cuyos niveles varían significativamente en ausencia de la RNasa R poseen los terminadores predichos. Por lo tanto, esta RNasa no parece tener una función importante, o al menos exclusiva, en la degradación de los terminadores de transcripción.

Los ARN mensajeros cuyos niveles aumentaban en ausencia de la RNasa R pertenecían a muchas categorías diferentes, pero destacaron por su número los genes pertenecientes a los operones flagelares. En nuestros ensayos los niveles de ARNm de *rpoN*, *fleQ*, *fleR* y *fliA* estaban elevados en la cepa carente de la RNasa R, mientras que los de *flgM* apenas variaron. FleQ es el principal regulador del regulón flagelar (33). FleQ, junto con el factor sigma alternativo RpoN, activa la expresión de los genes *flhF-flhN*, *fliEFGHIJ*, *fliLMNOPQR-flhB*, *fliA*, y *fleSR* (33). Los ensayos de transcriptómica y RT-PCR en tiempo real, detectaron niveles de ARNm elevados en muchos de estos genes (*flhF*, *fliE*, *flhB* y *fliR*). FleR también es

un regulador de otros operones de flagelos. El aumento en los niveles del ARNm del factor sigma alternativo *fliA*, que no estuvo acompañado de un aumento paralelo del ARNm de su anti-factor sigma *flgM*, posiblemente es responsable del aumento de la expresión de *fliC*, que codifica para la flagelina. Estos cambios en la expresión del regulón flagelar tienen consecuencias fenotípicas, ya que la cepa KTRNR1 (que carece de la RNasa R) presenta mayor motilidad que la silvestre.

En *E. coli*, la RNasa R se induce por golpe térmico frío (20, 24), aunque esto no ocurre en *P. syringae* (123). El hecho de que la ausencia de la RNasa R disminuya significativamente la velocidad de crecimiento de *P. putida* a 10°C indica que este enzima se vuelve especialmente importante a bajas temperaturas. En estas condiciones parece que otras nucleasas no pueden compensar su ausencia, probablemente debido a que a bajas temperaturas las estructuras secundarias del ARN son más estables. La expresión del gen *rnr* en *P. putida* aumentó ligeramente (menos de dos veces) después de un choque térmico de dos horas en el que la temperatura descendió de 30°C a 10°C, valor significativamente menor que el descrito para *E. coli* (aumento de ocho veces en las mismas condiciones). Además, el patrón de expresión del gen *rnr* de *P. putida* bajo diferentes condiciones de crecimiento es significativamente distinto al de *E. coli*. En esta última especie bacteriana, la RNasa R se induce tras el golpe térmico en frío, al crecer en medio mínimo y en fase estacionaria (24, 25). Sin embargo, en *P. putida*, sólo se induce significativamente en fase estacionaria. Estas diferencias podrían ser debidas a varias razones. Por una parte, *P. putida* carece de la RNasa II (50). En *E. coli*, esta RNasa, junto con la PNPasa y la RNasa R, son las encargadas de la degradación de ARNm (26, 38, 43). Por ello, es de esperar que al estar ausente una de ellas las restantes adquieran mayor importancia para la célula. Curiosamente, en *E. coli* la PNPasa es esencial para el crecimiento a bajas temperaturas (8) y forma parte de un complejo proteico denominado degradosoma (21, 22). Este complejo, que también se compone de ARN-helicases, se engrana alrededor de la RNasa E y se encarga de degradar ARNm (21). En *P. syringae*, por el contrario, la principal exonucleasa de este complejo es la RNasa R (122) y no la PNPasa. Tanto en *P. syringae* como en *P. putida*, la RNasa R no se induce a bajas temperaturas, pero sí es esencial para el crecimiento en esas condiciones (123), (este trabajo). Cabe la posibilidad de que estas diferencias entre *E. coli* y *Pseudomonas* se deban a la diferente composición de exonucleasas del degradosoma. Por lo tanto, sería interesante analizar la composición de este complejo en *P. putida*. Si es la RNasa R la ribonucleasa que forma parte del degradosoma, podría ser que esto fuera una característica del

género *Pseudomonas*. No obstante, la cepa de *P. syringae* en la que se identificó la RNasa R como exonucleasa principal del degradosoma se aisló en la Antártida, y está adaptada a crecer a baja temperatura (122). Por lo tanto, también cabría la posibilidad de que la composición del degradosoma cambie con la temperatura y la RNasa R forme parte del degradosoma sólo a baja temperatura. El degradosoma es un complejo dinámico. En *E. coli*, por ejemplo, la ARN-helicasa CsdA se induce a durante choque térmico a bajas temperaturas y forma parte del degradosoma sólo en esas condiciones (120).

En resumen, la RNasa R tiene una función importante en el metabolismo del ARN mensajero en *P. putida*, pero no parece particularmente relevante para el proceso de represión catabólica. La diversidad de genes cuya estabilidad depende de esta RNasa R explicaría el efecto pleiotrópico causado por su ausencia.

8.2 Análisis global de la adaptación a bajas temperaturas de *P. putida*

Dado que había algunos trabajos dispersos que sugerían que la temperatura de crecimiento afecta al proceso de represión catabólica (61, 89, 96), decidimos analizar cómo afecta la temperatura al transcriptoma y al proteoma de *P. putida* cuando crece en un medio rico, un medio que genera una fuerte represión. No existían antecedentes de un estudio de este tipo en *P. putida*, de forma que también fue útil para estudiar cómo se adapta esta bacteria a condiciones de baja temperatura. Los resultados mostraron que, cuando *P. putida* KT2440 pasa de crecer en LB a 30°C a crecer en este medio a 10°C, cambia la expresión de al menos 265 genes, es decir, cerca de un 5% del genoma. Al analizar la concordancia entre los análisis de transcriptómica y los de proteómica, observamos que un 42% de los genes que mostraban cambios en los experimentos de proteómica también mostraban cambios significativos en los análisis de transcriptómica. En todos estos genes, los cambios observados en ambos estudios fueron cualitativamente similares, lo que refuerza la solidez de los resultados. En los demás casos, la falta de coincidencia puede deberse a regulación postranscripcional, a que determinadas proteínas tengan una estabilidad mucho mayor que sus ARNm correspondientes, a las limitaciones inherentes a cada técnica experimental (p.e. baja sensibilidad de los *microarrays*, filtros estadísticos aplicados) o a combinaciones de estas causas (159). Estas

razones muestran la importancia de utilizar estas dos técnicas complementarias, mejor que sólo una de ellas.

De forma global, los resultados muestran que la adaptación de *P. putida* al crecimiento prolongado a 10°C conlleva cambios pronunciados en el patrón de la expresión génica. En muchos casos, estas modificaciones tienen como objetivo principal resolver los problemas derivados del descenso en la temperatura. Los principales cambios se producen en genes que afectan a la composición de la membrana celular, al procesamiento de ARNs y proteínas, a la composición y actividad de la cadena de transporte de electrones y a diversos aspectos del metabolismo. Los cambios observados en la expresión de genes de transporte y asimilación de diversas fuentes de carbono indican que las bajas temperaturas afectan claramente al proceso de represión catabólica en medio rico. Sin embargo, esto es sólo un aspecto más de un proceso adaptativo bastante amplio. Por esta razón, primero se discutirá el efecto de la temperatura en la fisiología general de la bacteria, y posteriormente se hará un análisis separado de su efecto en el caso particular de la represión catabólica

Al disminuir la temperatura de 30°C a 10°C se reduce bastante la fluidez de la membrana, lo cual afecta a sus propiedades funcionales. Las bacterias responden a este problema, fundamentalmente, modificando la composición de los lípidos de la membrana. En concreto, y dependiendo de la bacteria considerada, puede aumentar la proporción de ácidos grasos con menor punto de fusión (ácidos grasos insaturados, de cadena corta o de cadena ramificada), puede incrementarse la proporción de ácidos grasos *anteiso* con respecto a *iso*, o *cis* respecto a *trans* (30, 169), o puede modificarse la naturaleza de los lípidos de la membrana (30). En algunas especies bacterianas, como por ejemplo en *B. subtilis* (76, 109) o *Shewanella piezotolerans* (158), un descenso en la temperatura conlleva a un aumento en la cantidad de ácidos grasos de cadena ramificada en los lípidos de membrana y en el transporte de aminoácidos ramificados. La síntesis de ácidos grasos ramificados comienza con un cebador que es un α -cetoácido ramificado al que se va añadiendo el resto del esqueleto de carbono (77). Estos cetoácidos derivan de los primeros pasos de la ruta de asimilación de aminoácidos de cadena ramificada (valina, leucina e isoleucina). El crecimiento a 10°C produjo un aumento de los niveles de proteínas implicadas en el transporte y asimilación de estos aminoácidos. Por lo tanto, es posible que el aumento del catabolismo de aminoácidos ramificados contribuya a la síntesis de ácidos grasos de cadena ramificada para mantener la fluidez de las membranas. Sin embargo, en la mayoría de las

situaciones las membranas de *P. putida* no contienen ácidos grasos de cadena ramificada (49, 88, 104, 107). En algún caso, por ejemplo, en células creciendo a expensas de naftaleno, sí se han detectado estos ácidos grasos en *P. putida*, pero en pequeñas cantidades (105). Por lo tanto, no parece que los ácidos grasos ramificados jueguen un papel importante en la adaptación homeoviscosa de las membranas de *P. putida* a bajas temperaturas.

Muchas especies del género *Pseudomonas* responden a una bajada de temperatura aumentando la cantidad de ácidos grasos insaturados (40, 57, 65, 83). Este proceso puede ocurrir de dos formas, bien introduciendo un doble enlace en un ácido graso ya existente mediante una desaturasa, o bien sintetizando el ácido graso insaturado “*de novo*”. En el primer caso, *P. putida* KT2440 posee en su genoma un gen anotado como desaturasa (PP_0217), pero los análisis realizados mediante RT-PCR en tiempo real no detectaron variaciones en la expresión de este gen a 10°C respecto a 30°C. En el segundo caso, la síntesis de ácidos grasos insaturados puede llevarse a cabo por el producto de los genes *fabAB*, que introduce un doble enlace en la cadena acílica creciente (142, 170). Sin embargo, en nuestros resultados, no sólo no detectamos cambios en los niveles de *fabA*, sino que los de *fabB* incluso disminuyeron. No obstante, es posible que aunque la expresión de estos genes se mantenga constante, se produzcan cambios en la actividad enzimática, proceso que no se puede detectar con los análisis realizados en esta Tesis. Además, hemos detectado cambios en la expresión de varios genes que presumiblemente están relacionados con el metabolismo de ácidos grasos, pero estos procesos metabólicos en *Pseudomonas* son complejos y bastante desconocidos hasta el momento.

Uno de los principales problemas a los que se enfrentan los microorganismos a bajas temperaturas es la estabilización de las estructuras secundarias de los ácidos nucleicos (137). Esto se refleja en cambios en la expresión de algunas enzimas implicadas en el procesamiento del ARN. En nuestro estudio, comprobamos que la PNPasa aumentaba su expresión a 10°C, y que la ausencia de la RNasa R dificultaba el crecimiento en estas condiciones aunque su expresión no variaba. La PNPasa participa en la degradación del ARN mensajero y en el control de calidad del ARNr y ARNt (28). Además, es una enzima inducible por frío en algunas especies bacterianas como *E. coli*, o *Yersinia enterocolitica* y su inactivación conlleva un fenotipo de sensibilidad al frío en estas bacterias (60, 168). Sin embargo, en *P. putida* este fenotipo no se detecta en cepas carentes del gen *pnp* (50), es decir, la ausencia de este gen no afecta al crecimiento a bajas temperaturas. Como se ha comentado antes, es la RNasa R la que parece

ser más necesaria a bajas temperaturas en el género *Pseudomonas* (53, 123, 127). La RNasa R y la PNPasa solapan en algunas funciones, como la degradación de ARNs mensajeros con secuencias REP, procesamiento de ARNr, entre otras (26, 28), pero la RNasa R es muy activa frente a ARNs muy estructurados (9, 26, 28, 154-156).

Las bajas temperaturas también afectan al plegamiento de las proteínas, que si no se realiza correctamente da lugar a la formación de agregados proteicos. La solubilización de estos agregados por el sistema de chaperonas DnaK/DnaJ/GrpE y la proteasa ClpB aumenta significativamente cuando suben las concentraciones intracelulares de glutamato, aspartato y glicina-betaína (39). Curiosamente, el crecimiento de *P. putida* a 10°C produjo un aumento en la expresión del sistema Aat de transporte de glutamato y aspartato, así como de genes responsables del transporte de glicina-betaína. Es posible que esta respuesta ayude a eliminar los agregados proteicos acumulados a baja temperatura.

Las peptidil-prolil isomerasas también contribuyen al plegamiento proteico (135), y sus niveles aumentan en *B. subtilis* tras un choque frío (61) y durante el crecimiento prolongado a baja temperatura (19). En el caso de *P. putida*, la expresión de la peptidil-prolil isomerasa FlkB-1 aumentó cuando las células se cultivaron a 10°C.

El crecimiento a bajas temperaturas va acompañado de una reducción muy notable en la velocidad de crecimiento (unas ocho veces), lo que se refleja en la disminución de la expresión de genes cuyos productos alimentan la cadena de transporte de electrones, como los que codifican para la NADH-deshidrogenasa o la succinato deshidrogenasa.

También hemos observado que el crecimiento a 10°C implica una disminución considerable de la expresión de la oxidasa terminal Cbb3-1. *P. putida* posee al menos cinco oxidasa terminales, cuya expresión relativa varía según las condiciones ambientales (150). Las oxidasas terminales del tipo Cbb3 tienen mucha afinidad por el oxígeno (161). La expresión de la oxidasa terminal Cbb3-1 de *P. putida*, al igual que la de Cbb3-2 de *P. aeruginosa* (ambas son equivalentes (150)), se induce a bajas concentraciones de oxígeno (2, 31, 80, 150). Teniendo en cuenta que la solubilidad del oxígeno en agua aumenta a medida que la temperatura disminuye, podría ocurrir que la disminución en la expresión de la oxidasa terminal Cbb3-1 se deba a que la disponibilidad de oxígeno en el medio a 10°C es mayor que a 30°C. Las diferencias en la expresión de los genes

hemF/hemN refuerzan esta hipótesis. HemF y HemN catalizan la misma reacción en la ruta de síntesis del cofactor hemo. Sin embargo, la proteína HemF es dependiente de oxígeno mientras que HemN no lo es, de forma que la expresión de *hemN* aumenta cuando la concentración de oxígeno en el medio es baja. (64, 131). La expresión de *hemN* disminuyó más de diez veces a 10°C, dato que es coherente con una mayor disponibilidad de oxígeno en el medio.

Uno de los resultados más llamativos del estudio fue el elevado número de genes implicados en el transporte y asimilación de diversos compuestos cuya expresión cambió al disminuir la temperatura, especialmente aquellos implicados en metabolismo de aminoácidos. El medio LB se compone principalmente de aminoácidos y pequeños péptidos (136). Cuando *P. putida* crece exponencialmente en medio rico a 30°C, asimila los aminoácidos de forma jerarquizada, proceso que está regulado por la proteína Crc (100). El metabolismo de valina, isoleucina, leucina, treonina, fenilalanina, tirosina, glicina y serina está reprimido en estas condiciones. Sin embargo, a baja temperatura aumenta la expresión de los genes de las rutas de transporte de aminoácidos ramificados (Val, Leu, Ileu), aminoácidos ácidos, dipéptidos y glucosa, así como la de genes implicados en la asimilación de aminoácidos ramificados, fenilalanina, propionato, glucosa y gluconato, entre otros. El transporte y asimilación de muchos de estos compuestos está regulado por la proteína de represión catabólica Crc, lo que sugiere que el proceso de represión catabólica pueda estar alterado a baja temperatura, aspecto que se discutirá en el siguiente apartado. Finalmente, es destacable que a baja temperatura se activa el ciclo del 2-metilcitrato para asimilar el propionil-CoA derivado de la degradación de la valina e isoleucina.

Por otra parte, el ciclo de Krebs parece modificarse para adaptarse a la nueva situación. Por ejemplo, la expresión de la malato-quinona deshidrogenasa (Mqo-2), que forma parte de este ciclo, disminuye a 10°C. El paso de malato a oxalacetato puede realizarse mediante la acción de dos enzimas, la Mqo-2 y la MDH (malato deshidrogenasa). La actividad de estas enzimas depende de la fuente de carbono que se esté utilizando (94, 152). La expresión del gen *gltA*, que codifica para la citrato sintasa, aumentó su expresión a 10°C. En *Legionella pneumophila*, este gen es necesario para el crecimiento a bajas temperaturas, pero no a 37°C (139). Otro gen cuya expresión aumenta a 10°C es el de la isocitrato deshidrogenasa (PP_4012). Los resultados sugieren que las modificaciones que se producen en el metabolismo cuando las células crecen a 10°C llevan a que el ciclo de Krebs

se reajuste para optimizar el rendimiento energético, ya que muchos de los productos de rutas metabólicas afectadas entran en este ciclo.

8.3 Represión catabólica a bajas temperaturas

Como se ha mencionado en el apartado anterior, un resultado destacable de este trabajo es que un tercio de los genes cuya expresión cambia cuando *P. putida* se adapta a crecer a 10°C también están regulados, de forma directa o indirecta, por el regulador global Crc cuando las células crecen a 30°C en medio rico. La proteína Crc tiene una función importante en el fenómeno de represión catabólica que se observa cuando las células crecen en un medio rico (97, 100, 133, 167). El que muchos de los genes cuya expresión varía cuando la temperatura es baja estén regulados por Crc sugiere que el efecto de represión catabólica mediado por este regulador podría diferir según las células crezcan a 10°C o a 30°C. De hecho, cuando analizamos la represión catabólica ejercida sobre la ruta de degradación del benzoato, que está mediada por Crc (102), observamos que esta represión está parcialmente liberada cuando las células crecen en medio rico a 10°C. Este efecto no se observa, sin embargo, en la represión que afecta a la ruta de degradación de alcanos, que también depende de Crc, entre otros factores. A la vista de estos resultados, decidimos comparar el transcriptoma de la cepa silvestre con el su derivado carente del gen *crc*, en células creciendo a 10°C. Observamos que, en estas condiciones, la ausencia de Crc lleva a un aumento en la expresión de 10 genes y a una disminución en 48 genes. Estos resultados contrastan con los observados en células creciendo a 30°C en el mismo medio, donde la inactivación del gen *crc* lleva a que aumenten los niveles de ARNm de 69 genes y disminuyan los de otros 23 (100). Por lo tanto, parece que Crc modula la expresión de muchos menos genes a 10°C que a 30°C. En conjunto, los datos sugieren que, a 10°C, Crc tiene un efecto menor, o más selectivo que a 30°C.

Pueden pensarse varias razones por las que Crc sea menos efectivo, o más selectivo, a baja temperatura. Una de las posibles explicaciones sería que la expresión del gen *crc* fuese menor a 10°C que a 30°C. En medio LB a 30°C, los niveles de Crc son mayores durante el crecimiento en fase exponencial y disminuyen a medida que las células entran en fase estacionaria, aunque esta disminución no explica completamente la liberación de la represión al llegar a fase estacionaria (133). Sin embargo,

nuestros resultados indican que los niveles de ARNm de *crc* a 10°C sólo disminuyen levemente con respecto a 30°C, y los niveles de proteína Crc no varían de forma detectable. Por lo tanto, el menor efecto represor de Crc a bajas temperaturas no parece deberse a una menor cantidad de Crc.

En *P. aeruginosa* se ha descrito un ARN pequeño llamado CrcZ que es capaz de secuestrar Crc, impidiendo de esta forma que se una a los ARNm que reconoce de forma específica (140). La cantidad de CrcZ varía con las distintas fuentes de carbono y está regulada por el sistema de dos componentes CbrA/B (140). CrcZ está codificado entre los genes *cbrB* y *pcnB*. Al analizar la zona intergénica que hay entre los genes *cbrB* y *pcnB* de *P. putida*, localizamos una región que podía codificar un RNA muy parecido al CrcZ descrito en *P. aeruginosa*, con varias regiones que pueden ser dianas potenciales para Crc. Ensayos de RT-PCR en tiempo real demostraron que esta región se transcribe, dando lugar a un ARN cuyos niveles varían según las condiciones de crecimiento. Estos niveles son más bajos cuando la bacteria crece exponencialmente en medio rico, y muy elevados cuando la bacteria alcanza la fase estacionaria de crecimiento, o cuando crece en medios con fuentes de carbono “pobres” como citrato o succinato, que no generan represión catabólica dependiente de Crc en *P. putida*. Además, hemos confirmado que, al igual que en *P. aeruginosa*, la expresión de este ARN depende del sistema CbrA/CbrB. Todos estos datos apoyan que este ARN es el homólogo de CrcZ en *P. putida*.

Utilizando como modelo los genes de la ruta para asimilación de benzoato, cuya expresión está fuertemente inhibida por Crc cuando las células crecen en un medio rico a 30°C, hemos analizado si hay correlación entre los niveles de CrcZ y los niveles de inducción de esta ruta. Observamos que los niveles de CrcZ son mayores en aquellas condiciones en las que la represión catabólica dependiente de Crc es menor. Estos resultados están de acuerdo con la hipótesis de que al aumentar la expresión de CrcZ hay menos Crc libre disponible y, por lo tanto, disminuye el efecto represor sobre determinadas rutas metabólicas (140).

Hemos comprobado que los niveles de CrcZ son mayores a 10°C que a 30°C, lo que implica que la cantidad de proteína Crc disponible para ejercer la función de represión catabólica es menor a bajas temperaturas. Esto puede explicar que la represión sea menor a bajas temperaturas. Aun así, los niveles no son tan altos como los alcanzados en las condiciones de mayor represión catabólica, lo que significa que, aunque parte de la proteína Crc estaría siendo secuestrada, todavía quedaría suficiente proteína disponible

para unirse a algunos mensajeros, probablemente aquellos con dianas más expuestas o por las que Crc tiene mayor afinidad. Esto podría explicar por qué a bajas temperaturas la liberación de la represión es muy clara en algunos genes, como los de la ruta de asimilación de benzoato o de aminoácidos ramificados, pero no en otros como los de la ruta de degradación de alcanos.

El RNA pequeño CrcZ parece ser importante en la regulación mediada por Crc, pero hay indicios que nos hacen sospechar que podría existir algún otro factor implicado en este proceso. La importancia de CrcZ y su capacidad para secuestrar a la proteína Crc queda confirmada por el hecho de que al sobreexpresar este ARNp desde un promotor heterólogo observamos una clara liberación de la represión catabólica en la ruta de degradación de benzoato. Sin embargo, si CrcZ fuera el único responsable de secuestrar Crc en condiciones en que es necesario liberar la represión catabólica (crecimiento en fuentes de carbono pobres, por ejemplo en medio mínimo con citrato como fuente de carbono), esperaríamos que la delección de CrcZ diera lugar a un fenotipo de represión constitutiva, ya que siempre habría Crc disponible para reprimir. Sin embargo, la delección de CrcZ no da lugar a represión en medio mínimo con citrato o succinato, es decir, aún eliminando CrcZ parece que sigue habiendo algún factor que impide que Crc actúe. Una posibilidad es que exista otro ARN pequeño capaz de secuestrar Crc aun en ausencia de CrcZ.

Esta idea viene apoyada por el comportamiento de los genes de asimilación de aminoácidos ramificados. En medio rico, la expresión de estos genes también está inhibida por la proteína Crc cuando las células crecen a 30°C (67). Como se ha comentado, al crecer las células a 10°C la expresión de los genes de asimilación de aminoácidos ramificados es bastante mayor. Esto está de acuerdo con la idea de que la menor represión de estos genes a 10°C se debe a que, a esta temperatura, los niveles de CrcZ son mayores y, por tanto, el efecto inhibitor de Crc es menor. Nuestros datos demuestran que si se inactiva el RNA regulador CrcZ, la expresión de los genes de asimilación de aminoácidos ramificados a 10°C disminuye unas tres veces respecto la observada en la cepa silvestre. Sin embargo, esta expresión sigue siendo mayor que a 30°C. En otras palabras, parece que existe otro factor, además de CrcZ, que modula el efecto represor de Crc.

La existencia de varios ARNs pequeños que secuestran una misma proteína ya se ha descrito previamente en otros microorganismos. En *Vibrio cholerae*, la respuesta de *quorum-sensing* mediada por el regulador

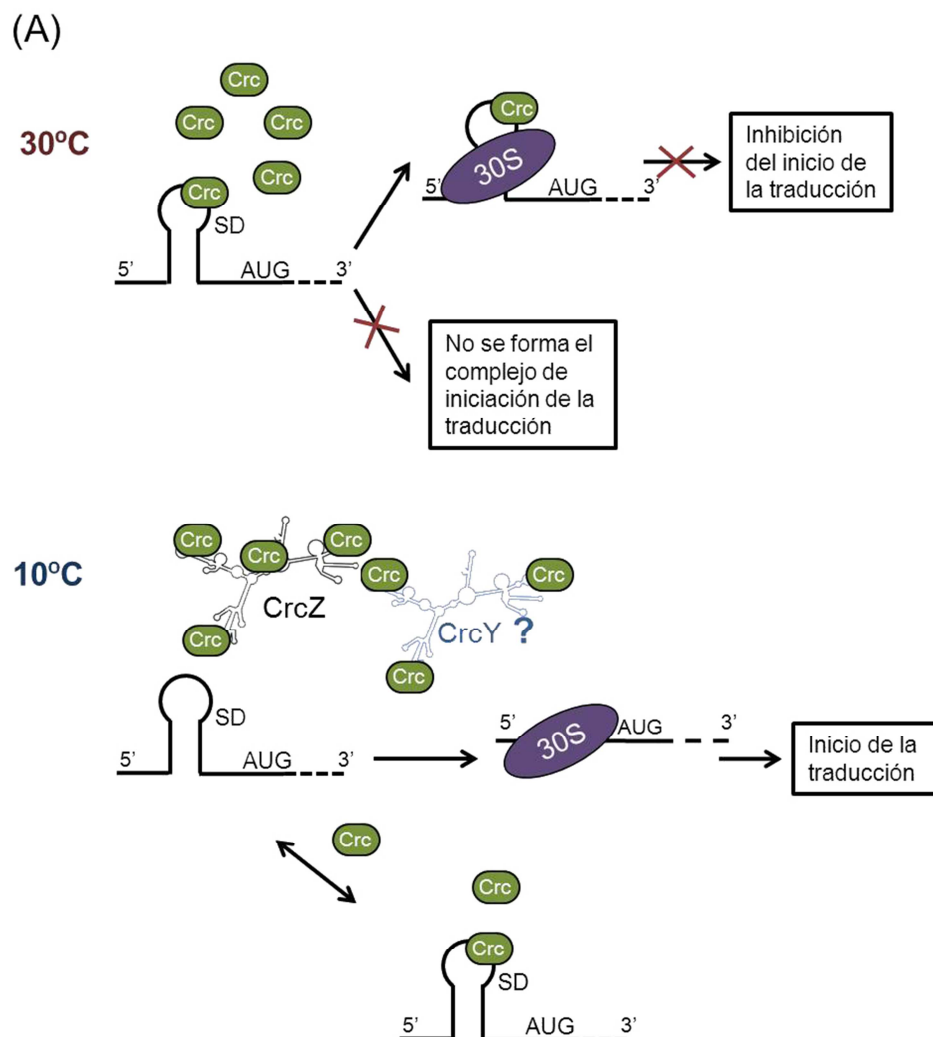
transcripcional HapR se reprime por la acción de cuatro ARNs pequeños redundantes y Hfq, una chaperona de ARNs pequeños. El efecto represor ejercido por estos ARNs sólo desaparece cuando no está presente ninguno de los cuatro ARNs, mientras que la sobreexpresión de uno de ellos es suficiente para obtener de nuevo el fenotipo de represión. Gracias a este sistema, *Vibrio* consigue una regulación muy sensible de la respuesta de *quorum sensing* (85). En el género *Pseudomonas*, concretamente en *P. fluorescens* CHA0, también se han descrito tres ARNs pequeños redundantes que, en conjunto, reprimen a dos proteínas de unión a ARN denominadas RmsA y RmsE. Los tres ARNs pequeños están regulados por el sistema de dos componentes GacS/GacA. Este sistema es clave para la producción de antibióticos (81). Por lo tanto, una posible explicación para el escaso efecto observado al inactivar CrcZ podría ser que exista otro ARN pequeño en *P. putida* que modulare la actividad de Crc junto con CrcZ. Este hecho justificaría que al deletar CrcZ no se observe un fenotipo hiperrepresor pero que al sobreexpresarlo sí se libere la represión. En apoyo de esta idea, recientemente hemos encontrado en el genoma de *P. putida* otra región intergénica que posee, al igual que CrcZ, seis posibles sitios de unión para Crc, que se expresa de forma diferencial según las condiciones de crecimiento. Pensamos que esta región codifica para otro ARN pequeño que corregularía la cantidad de Crc disponible en cada situación. La caracterización de este ARN pequeño está actualmente en curso.

La proteína Crc regula gran cantidad de rutas metabólicas optimizando el metabolismo en *Pseudomonas* (revisado en Rojo 2010 (129)). En consecuencia, su actividad tiene que modularse muy finamente integrando las señales ambientales y fisiológicas para responder a las necesidades metabólicas de la célula en cada momento. Un sistema de varios ARNs pequeños que responden a diferentes señales proporcionaría una regulación fina de la represión catabólica permitiendo una respuesta adecuada de la célula en diferentes situaciones. Por ejemplo, en el caso de baja temperatura, permitirían una liberación parcial de determinadas rutas, como la de degradación de aminoácidos ramificados o la de degradación de benzoato. Al haber todavía Crc libre, se uniría a aquellas dianas por las que tuviera más afinidad.

Además de este sistema de dos ARNs pequeños cuyos niveles varían según las condiciones de crecimiento, y que serían capaces de secuestrar Crc, puede haber otros factores que también influyan en determinadas condiciones. Por ejemplo, los cambios en la estructura del ARN que puedan darse cuando baja la temperatura también podrían afectar a la disponibilidad

de las dianas de Crc en los ARNs mensajeros que regula, o en los ARNs pequeños que secuestran Crc. Las predicciones informáticas de estructura las posibles estructuras secundarias a 10°C, dentro de su limitada fiabilidad, parecen confirmar esta posibilidad para algunos mensajeros. Por ejemplo, en el caso del mensajero de *benR*, la predicción de estructura a 10°C parece ocultar el sitio de unión de Crc, mientras que para el caso de *alkS* esto no sucedería (datos no mostrados).

En resumen, los datos disponibles nos permiten proponer un modelo para explicar el efecto de la temperatura en la represión catabólica mediada por Crc que estaría basado, fundamentalmente, en la presencia de dos ARNs pequeños capaces de secuestrar Crc, y cuyos niveles y/o capacidad para secuestrar Crc son mayores a baja temperatura. Este modelo se ilustra en la Figura 32.



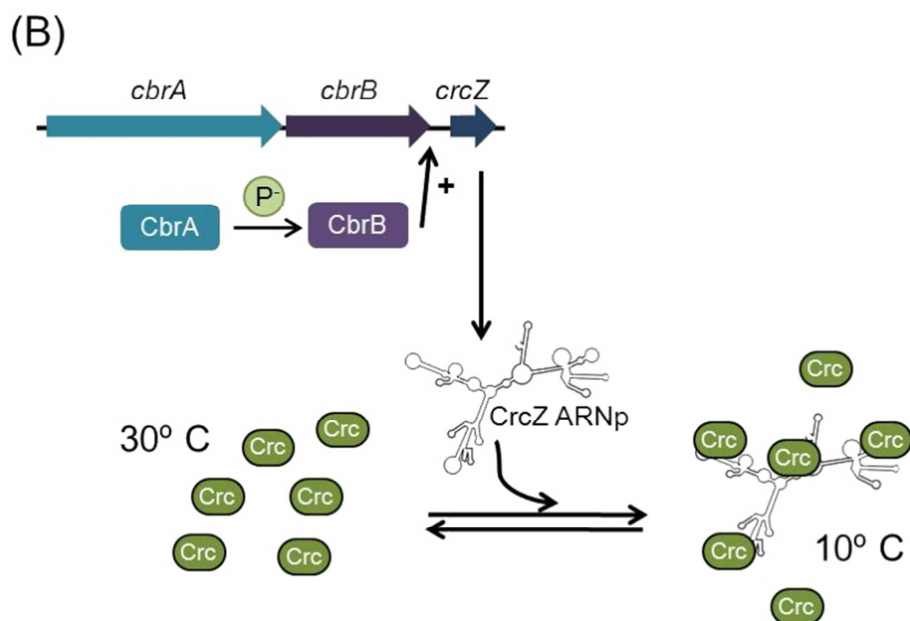


Figura 32. Modelo de represión catabólica mediado por Crc en medio rico en en función de la temperatura (modificado de Rojo 2010)(129). (A) A 30°C, los niveles de Crc libre son mayores y se unen a los sitios específicos de los ARN diana que solapan con el codón de inicio de la traducción AUG. De esta forma se inhibe la formación de de un complejo de iniciación de la traducción funcional. Crc puede competir con la subunidad ribosomal 30S por la unión al ARN o atrapando a la subunidad 30S en un complejo inactivo. A 10°C, la cantidad de CrcZ y presumiblemente del hipotético RNAp CrcY es mayor, secuestrando gran parte de la proteína Crc libre y permitiendo la traducción de ARN mensajero. La fracción de Crc que aún está libre a 10°C aún sería capaz de unirse a algunas dianas, por lo que liberación de la represión catabólica a 10°C sería parcial. (B) La expresión de CrcZ requiere el sistema de dos componentes CbrA/B para su expresión.

9 CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La RNasa R no parece estar implicada en el fenómeno de represión catabólica en *P. putida* en las condiciones analizadas.
2. La RNasa R tiene una función importante en el metabolismo del ARN mensajero en *P. putida* y es responsable directa de la degradación de algunos ARNm que son más difícilmente eliminados por otras RNasas. La expresión de esta nucleasa aumenta en fase estacionaria y tras un golpe de frío. Este patrón de expresión es diferente al de *E. coli*, probablemente debido al distinto modo de vida de ambos microorganismos.
3. La ausencia de la RNasa R conlleva a un fenotipo de mayor motilidad, producto del aumento de los niveles de ARNm de una gran parte de los reguladores flagelares. Además, la RNasa R es importante para el crecimiento a baja temperatura en *P. putida*.
4. La adaptación de *P. putida* al crecimiento a baja temperatura implica una transformación importante del patrón de expresión génica. Muchas de estas modificaciones tienen como objetivo paliar problemas derivados de este estrés térmico. Entre las alteraciones, destacan genes implicados en el transporte y asimilación de diversos compuestos, en el procesamiento de ARN y proteínas, en la actividad y composición de la cadena de transporte de electrones y en el metabolismo energético.
5. La baja temperatura es un factor que afecta al fenómeno de represión catabólica, ya que cuando las células crecen a 10°C se produce un cambio considerable en el patrón de expresión de genes que están regulados por represión catabólica, como los implicados en el transporte y asimilación de diversos sustratos. Esta liberación de la represión catabólica parece estar relacionada con el regulador Crc.

Conclusiones

6. *P. putida*, igual que *P. aeruginosa*, posee un ARN pequeño, CrcZ, capaz de secuestrar Crc. Los niveles son mayores en condiciones en las que se libera la represión catabólica.
7. Los niveles de CrcZ son mayores a 10°C que a 30°C, lo que está de acuerdo con la liberación de la represión catabólica a baja temperatura. Sin embargo una cepa mutante en CrcZ no posee un fenotipo hiperrepresor. Esto sugiere que podría existir al menos otro ARN pequeño que, junto con CrcZ, modula la cantidad de Crc libre en la célula.

10 BIBLIOGRAFÍA

1. **Aislabie, J., D. J. Saul, and J. M. Foght.** 2006. Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. *Extremophiles* **10**:171-9.
2. **Alvarez-Ortega, C., and C. S. Harwood.** 2007. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to low oxygen indicate that growth in the cystic fibrosis lung is by aerobic respiration. *Mol Microbiol* **65**:153-65.
3. **Amador, C. I., I. Canosa, F. Govantes, and E. Santero.** Lack of CbrB in *Pseudomonas putida* affects not only amino acids metabolism but also different stress responses and biofilm development. *Environ Microbiol* **12**:1748-61.
4. **Andrade, J. M., F. Cairrao, and C. M. Arraiano.** 2006. RNase R affects gene expression in stationary phase: regulation of ompA. *Mol Microbiol* **60**:219-28.
5. **Andrade, J. M., E. Hajnsdorf, P. Regnier, and C. M. Arraiano.** 2009. The poly(A)-dependent degradation pathway of rpsO mRNA is primarily mediated by RNase R. *RNA* **15**:316-26.
6. **Aranda-Olmedo, I., J. L. Ramos, and S. Marques.** 2005. Integration of signals through Crc and PtsN in catabolite repression of *Pseudomonas putida* TOL plasmid pWW0. *Appl Environ Microbiol* **71**:4191-8.
7. **Aranda-Olmedo, I., R. Tobes, M. Manzanera, J. L. Ramos, and S. Marques.** 2002. Species-specific repetitive extragenic palindromic (REP) sequences in *Pseudomonas putida*. *Nucleic Acids Res* **30**:1826-33.
8. **Awano, N., M. Inouye, and S. Phadtare.** 2008. RNase activity of polynucleotide phosphorylase is critical at low temperature in *Escherichia coli* and is complemented by RNase II. *J Bacteriol* **190**:5924-33.
9. **Awano, N., V. Rajagopal, M. Arbing, S. Patel, J. Hunt, M. Inouye, and S. Phadtare.** 2010. *Escherichia coli* RNase R has dual activities, helicase and RNase. *J Bacteriol* **192**:1344-52.
10. **Awano, N., C. Xu, H. Ke, K. Inoue, M. Inouye, and S. Phadtare.** 2007. Complementation analysis of the cold-sensitive phenotype of the *Escherichia coli* csdA deletion strain. *J Bacteriol* **189**:5808-15.
11. **Baev, M. V., D. Baev, A. J. Radek, and J. W. Campbell.** 2006. Growth of *Escherichia coli* MG1655 on LB medium: monitoring utilization of amino acids, peptides, and nucleotides with transcriptional microarrays. *Appl Microbiol Biotechnol* **71**:317-22.
12. **Bagdasarian, M., R. Lurz, B. Ruckert, F. C. Franklin, M. M. Bagdasarian, J. Frey, and K. N. Timmis.** 1981. Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* **16**:237-47.
13. **Bauchop, T., and S. R. Elsdén.** 1960. The growth of micro-organisms in relation to their energy supply. *J Gen Microbiol* **23**:457-69.
14. **Beckering, C. L., L. Steil, M. H. Weber, U. Volker, and M. A. Marahiel.** 2002. Genomewide transcriptional analysis of the cold shock response in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **184**:6395-402.
15. **Benjamini Y., H. Y.** 1995. Controlling the False Discovery Rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Statist. Soc.* **57**:289-300.
16. **Bland JM., A. D.** 1995. Multiple significance tests: the Bonferroni method. *BMJ* **310**.
17. **Bresolin, G., K. Neuhaus, S. Scherer, and T. M. Fuchs.** 2006. Transcriptional analysis of long-term adaptation of *Yersinia enterocolitica* to low-temperature growth. *J Bacteriol* **188**:2945-58.
18. **Browne, P., M. Barret, F. O'Gara, and J. P. Morrissey.** Computational prediction of the Crc regulon identifies genus-wide and species-specific targets of catabolite repression control in *Pseudomonas* bacteria. *BMC Microbiol* **10**:300.

19. **Budde, I., L. Steil, C. Scharf, U. Volker, and E. Bremer.** 2006. Adaptation of *Bacillus subtilis* to growth at low temperature: a combined transcriptomic and proteomic appraisal. *Microbiology* **152**:831-53.
20. **Cairrao, F., A. Cruz, H. Mori, and C. M. Arraiano.** 2003. Cold shock induction of RNase R and its role in the maturation of the quality control mediator SsrA/tmRNA. *Mol Microbiol* **50**:1349-60.
21. **Carpousis, A. J.** 2007. The RNA degradosome of *Escherichia coli*: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E. *Annu Rev Microbiol* **61**:71-87.
22. **Carpousis, A. J., G. Van Houwe, C. Ehretsmann, and H. M. Krisch.** 1994. Copurification of *E. coli* RNAase E and PNPase: evidence for a specific association between two enzymes important in RNA processing and degradation. *Cell* **76**:889-900.
23. **Chan, Y. C., S. Raengpradub, K. J. Boor, and M. Wiedmann.** 2007. Microarray-based characterization of the *Listeria monocytogenes* cold regulon in log- and stationary-phase cells. *Appl Environ Microbiol* **73**:6484-98.
24. **Chen, C., and M. P. Deutscher.** 2005. Elevation of RNase R in response to multiple stress conditions. *J Biol Chem* **280**:34393-6.
25. **Chen, C., and M. P. Deutscher.** RNase R is a highly unstable protein regulated by growth phase and stress. *RNA* **16**:667-72.
26. **Cheng, Z. F., and M. P. Deutscher.** 2005. An important role for RNase R in mRNA decay. *Mol Cell* **17**:313-8.
27. **Cheng, Z. F., and M. P. Deutscher.** 2002. Purification and characterization of the *Escherichia coli* exoribonuclease RNase R. Comparison with RNase II. *J Biol Chem* **277**:21624-9.
28. **Cheng, Z. F., and M. P. Deutscher.** 2003. Quality control of ribosomal RNA mediated by polynucleotide phosphorylase and RNase R. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:6388-93.
29. **Cheng, Z. F., Y. Zuo, Z. Li, K. E. Rudd, and M. P. Deutscher.** 1998. The *vacB* gene required for virulence in *Shigella flexneri* and *Escherichia coli* encodes the exoribonuclease RNase R. *J Biol Chem* **273**:14077-80.
30. **Chintalapati, S., M. D. Kiran, and S. Shivaji.** 2004. Role of membrane lipid fatty acids in cold adaptation. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **50**:631-42.
31. **Comolli, J. C., and T. J. Donohue.** 2004. Differences in two *Pseudomonas aeruginosa* *cbb3* cytochrome oxidases. *Mol Microbiol* **51**:1193-203.
32. **Dasgupta, N., S. K. Arora and R. Ramphal.** 2004. The flagellar system of *Pseudomonas aeruginosa* J. L. Ramos (ed.) *Pseudomonas* Kluwer Academic, New York, NY 1:675-698.
33. **Dasgupta, N., M. C. Wolfgang, A. L. Goodman, S. K. Arora, J. Jyot, S. Lory, and R. Ramphal.** 2003. A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **50**:809-24.
34. **de Lorenzo, V., L. Eltis, B. Kessler, and K. N. Timmis.** 1993. Analysis of *Pseudomonas* gene products using *lacIq*/*P_{trp}-lac* plasmids and transposons that confer conditional phenotypes. *Gene* **123**:17-24.
35. **de Lorenzo, V., M. Herrero, U. Jakubzik, and K. N. Timmis.** 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J Bacteriol* **172**:6568-72.
36. **de Lorenzo, V., and K. N. Timmis.** 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol* **235**:386-405.

37. **del Castillo, T., and J. L. Ramos.** 2007. Simultaneous catabolite repression between glucose and toluene metabolism in *Pseudomonas putida* is channeled through different signaling pathways. *J Bacteriol* **189**:6602-10.
38. **Deutscher, M. P.** 2006. Degradation of RNA in bacteria: comparison of mRNA and stable RNA. *Nucleic Acids Res* **34**:659-66.
39. **Diamant, S., D. Rosenthal, A. Azem, N. Eliahu, A. P. Ben-Zvi, and P. Goloubinoff.** 2003. Dicarboxylic amino acids and glycine-betaine regulate chaperone-mediated protein-disaggregation under stress. *Mol Microbiol* **49**:401-10.
40. **Diefenbach, R., Heipieper, H.J. and Keweloh, H. .** 1992. The conversion of cis into trans unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* P8: evidence for a role in the regulation of membrane fluidity *Applied Microbiology and Biotechnology* **38**:382-387.
41. **Dinamarca, M. A., I. Aranda-Olmedo, A. Puyet, and F. Rojo.** 2003. Expression of the *Pseudomonas putida* OCT plasmid alkane degradation pathway is modulated by two different global control signals: evidence from continuous cultures. *J Bacteriol* **185**:4772-8.
42. **Dinamarca, M. A., A. Ruiz-Manzano, and F. Rojo.** 2002. Inactivation of cytochrome o ubiquinol oxidase relieves catabolic repression of the *Pseudomonas putida* GPo1 alkane degradation pathway. *J Bacteriol* **184**:3785-93.
43. **Donovan, W. P., and S. R. Kushner.** 1986. Polynucleotide phosphorylase and ribonuclease II are required for cell viability and mRNA turnover in *Escherichia coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:120-4.
44. **Dos Santos, V. A., S. Heim, E. R. Moore, M. Stratz, and K. N. Timmis.** 2004. Insights into the genomic basis of niche specificity of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* **6**:1264-86.
45. **Erova, T. E., V. G. Kosykh, A. A. Fadl, J. Sha, A. J. Horneman, and A. K. Chopra.** 2008. Cold Shock Exoribonuclease R (VacB) Is Involved in *Aeromonas hydrophila* Pathogenesis. *J Bacteriol*.
46. **Espinosa-Urgel, M., R. Kolter, and J. L. Ramos.** 2002. Root colonization by *Pseudomonas putida*: love at first sight. *Microbiology* **148**:341-3.
47. **Espinosa-Urgel, M., A. Salido, and J. L. Ramos.** 2000. Genetic analysis of functions involved in adhesion of *Pseudomonas putida* to seeds. *J Bacteriol* **182**:2363-9.
48. **Ewering, C., F. Heuser, J. K. Benolken, C. O. Bramer, and A. Steinbuchel.** 2006. Metabolic engineering of strains of *Ralstonia eutropha* and *Pseudomonas putida* for biotechnological production of 2-methylcitric acid. *Metab Eng* **8**:587-602.
49. **Fang, J., D. Y. Lyon, M. R. Wiesner, J. Dong, and P. J. Alvarez.** 2007. Effect of a fullerene water suspension on bacterial phospholipids and membrane phase behavior. *Environ Sci Technol* **41**:2636-42.
50. **Favaro, R., and G. Deho.** 2003. Polynucleotide phosphorylase-deficient mutants of *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* **185**:5279-86.
51. **Ferrer, M., T. N. Chernikova, M. M. Yakimov, P. N. Golyshin, and K. N. Timmis.** 2003. Chaperonins govern growth of *Escherichia coli* at low temperatures. *Nat Biotechnol* **21**:1266-7.
52. **Figurski, D. H., and D. R. Helinski.** 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:1648-52.
53. **Fonseca, P., R. Moreno, and F. Rojo.** 2008. Genomic analysis of the role of RNase R in the turnover of *Pseudomonas putida* mRNAs. *J Bacteriol* **190**:6258-63.

54. **Fonseca P. , Moreno Renata, and F. Rojo.** 2011, In press (early view). Growth of *Pseudomonas putida* at low temperature: global transcriptomic and proteomic analyses. *Environmental Microbiology Reports*.
55. **Franklin, F. C., M. Bagdasarian, M. M. Bagdasarian, and K. N. Timmis.** 1981. Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWWO from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta cleavage pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**:7458-62.
56. **Fujita, Y.** 2009. Carbon catabolite control of the metabolic network in *Bacillus subtilis*. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**:245-59.
57. **Gill, C. O.** 1975. Effect of growth temperature on the lipids of *Pseudomonas fluorescens*. *J Gen Microbiol* **89**:293-8.
58. **Giuliodori, A. M., A. Brandi, C. O. Gualerzi, and C. L. Pon.** 2004. Preferential translation of cold-shock mRNAs during cold adaptation. *RNA* **10**:265-76.
59. **Gorke, B., and J. Stulke.** 2008. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol* **6**:613-24.
60. **Goverde, R. L., J. H. Huis in't Veld, J. G. Kusters, and F. R. Mooi.** 1998. The psychrotrophic bacterium *Yersinia enterocolitica* requires expression of *pnp*, the gene for polynucleotide phosphorylase, for growth at low temperature (5 degrees C). *Mol Microbiol* **28**:555-69.
61. **Graumann, P., K. Schroder, R. Schmid, and M. A. Marahiel.** 1996. Cold shock stress-induced proteins in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **178**:4611-9.
62. **Gualerzi, C. O., A. M. Giuliodori, and C. L. Pon.** 2003. Transcriptional and post-transcriptional control of cold-shock genes. *J Mol Biol* **331**:527-39.
63. **Hanahan, D., and M. Meselson.** 1983. Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol* **100**:333-42.
64. **Heinemann I. U., J. D.** 2008. The biochemistry of heme biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* **474**:238-251.
65. **Heipieper, H. J., G. Meulenbeld, Q. van Oirschot, and J. de Bont.** 1996. Effect of Environmental Factors on the trans/cis Ratio of Unsaturated Fatty Acids in *Pseudomonas putida* S12. *Appl Environ Microbiol* **62**:2773-7.
66. **Herrero, M., V. de Lorenzo, and K. N. Timmis.** 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **172**:6557-67.
67. **Hester, K. L., J. Lehman, F. Najar, L. Song, B. A. Roe, C. H. MacGregor, P. W. Hager, P. V. Phibbs, Jr., and J. R. Sokatch.** 2000. *crc* is involved in catabolite repression control of the *bkd* operons of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**:1144-9.
68. **Hester, K. L., K. T. Madhusudhan, and J. R. Sokatch.** 2000. Catabolite repression control by *crc* in 2xYT medium is mediated by posttranscriptional regulation of *bkdR* expression in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* **182**:1150-3.
69. **Hong, S. J., Q. A. Tran, and K. C. Keller.** 2005. Cell cycle-regulated degradation of tmRNA is controlled by RNase R and SmpB. *Mol Microbiol* **57**:565-75.
70. **Horswill, A. R., A. R. Dudding, and J. C. Escalante-Semerena.** 2001. Studies of propionate toxicity in *Salmonella enterica* identify 2-methylcitrate as a potent inhibitor of cell growth. *J Biol Chem* **276**:19094-101.
71. **Horswill, A. R., and J. C. Escalante-Semerena.** 2001. In vitro conversion of propionate to pyruvate by *Salmonella enterica* enzymes: 2-methylcitrate dehydratase (PrpD) and aconitase Enzymes catalyze the conversion of 2-methylcitrate to 2-methylisocitrate. *Biochemistry* **40**:4703-13.

72. **Horswill, A. R., and J. C. Escalante-Semerena.** 1999. Salmonella typhimurium LT2 catabolizes propionate via the 2-methylcitric acid cycle. *J Bacteriol* **181**:5615-23.
73. **Inouye, M., and S. Phadtare.** 2004. Cold shock response and adaptation at near-freezing temperature in microorganisms. *Sci STKE* **2004**:pe26.
74. **Ishihama, A.** 2000. Functional modulation of Escherichia coli RNA polymerase. *Annu Rev Microbiol* **54**:499-518.
75. **Jishage, M., A. Iwata, S. Ueda, and A. Ishihama.** 1996. Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in Escherichia coli: intracellular levels of four species of sigma subunit under various growth conditions. *J Bacteriol* **178**:5447-51.
76. **Kaan, T., G. Homuth, U. Mader, J. Bandow, and T. Schweder.** 2002. Genome-wide transcriptional profiling of the Bacillus subtilis cold-shock response. *Microbiology* **148**:3441-55.
77. **Kaneda, T.** 1991. Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiol Rev* **55**:288-302.
78. **Kaniga, K., I. Delor, and G. R. Cornelis.** 1991. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the blaA gene of Yersinia enterocolitica. *Gene* **109**:137-41.
79. **Karzai, A. W., and R. T. Sauer.** 2001. Protein factors associated with the SsrA.SmpB tagging and ribosome rescue complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:3040-4.
80. **Kawakami, T., M. Kuroki, M. Ishii, Y. Igarashi, and H. Arai.** Differential expression of multiple terminal oxidases for aerobic respiration in Pseudomonas aeruginosa. *Environ Microbiol* **12**:1399-412.
81. **Kay, E., C. Dubuis, and D. Haas.** 2005. Three small RNAs jointly ensure secondary metabolism and biocontrol in Pseudomonas fluorescens CHA0. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:17136-41.
82. **Kazakov, A. E., D. A. Rodionov, E. Alm, A. P. Arkin, I. Dubchak, and M. S. Gelfand.** 2009. Comparative genomics of regulation of fatty acid and branched-chain amino acid utilization in proteobacteria. *J Bacteriol* **191**:52-64.
83. **Kropinski, A. M., V. Lewis, and D. Berry.** 1987. Effect of growth temperature on the lipids, outer membrane proteins, and lipopolysaccharides of Pseudomonas aeruginosa PAO. *J Bacteriol* **169**:1960-6.
84. **Lalonde, M. S., Y. Zuo, J. Zhang, X. Gong, S. Wu, A. Malhotra, and Z. Li.** 2007. Exoribonuclease R in Mycoplasma genitalium can carry out both RNA processing and degradative functions and is sensitive to RNA ribose methylation. *RNA* **13**:1957-68.
85. **Lenz, D. H., K. C. Mok, B. N. Lilley, R. V. Kulkarni, N. S. Wingreen, and B. L. Bassler.** 2004. The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in Vibrio harveyi and Vibrio cholerae. *Cell* **118**:69-82.
86. **Linares, J. F., R. Moreno, A. Fajardo, L. Martinez-Solano, R. Escalante, F. Rojo, and J. L. Martinez.** The global regulator Crc modulates metabolism, susceptibility to antibiotics and virulence in Pseudomonas aeruginosa. *Environ Microbiol* **12**:3196-212.
87. **Livak, K. J., and T. D. Schmittgen.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**:402-8.
88. **Loffhagen, N., C. Hartig, and W. Babel.** 2004. Pseudomonas putida NCTC 10936 balances membrane fluidity in response to physical and chemical stress by changing the saturation degree and the trans/cis ratio of fatty acids. *Biosci Biotechnol Biochem* **68**:317-23.

89. **Lynch, W. H., and M. Franklin.** 1978. Effect of temperature on diauxic growth with glucose and organic acids in *Pseudomonas fluorescens*. *Arch Microbiol* **118**:133-40.
90. **Macfarlane, E. L., A. Kwasnicka, M. M. Ochs, and R. E. Hancock.** 1999. PhoP-PhoQ homologues in *Pseudomonas aeruginosa* regulate expression of the outer-membrane protein OprH and polymyxin B resistance. *Mol Microbiol* **34**:305-16.
91. **MacGregor, C. H., S. K. Arora, P. W. Hager, M. B. Dail, and P. V. Phibbs, Jr.** 1996. The nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* *pyrE-crc-rph* region and the purification of the *crc* gene product. *J Bacteriol* **178**:5627-35.
92. **Matilla, M. A., J. L. Ramos, E. Duque, J. de Dios Alche, M. Espinosa-Urgel, and M. I. Ramos-Gonzalez.** 2007. Temperature and pyoverdine-mediated iron acquisition control surface motility of *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* **9**:1842-50.
93. **Miller, J. H.** 1992. A short course in bacterial genetics. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
94. **Molenaar, D., M. E. van der Rest, A. Drysch, and R. Yucel.** 2000. Functions of the membrane-associated and cytoplasmic malate dehydrogenases in the citric acid cycle of *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **182**:6884-91.
95. **Molina-Henares, M. A., J. de la Torre, A. Garcia-Salamanca, A. J. Molina-Henares, M. C. Herrera, J. L. Ramos, and E. Duque.** Identification of conditionally essential genes for growth of *Pseudomonas putida* KT2440 on minimal medium through the screening of a genome-wide mutant library. *Environ Microbiol* **12**:1468-85.
96. **Monedero, V., A. Maze, G. Boel, M. Zuniga, S. Beaufils, A. Hartke, and J. Deutscher.** 2007. The phosphotransferase system of *Lactobacillus casei*: regulation of carbon metabolism and connection to cold shock response. *J Mol Microbiol Biotechnol* **12**:20-32.
97. **Morales, G., J. F. Linares, A. Beloso, J. P. Albar, J. L. Martinez, and F. Rojo.** 2004. The *Pseudomonas putida* Crc global regulator controls the expression of genes from several chromosomal catabolic pathways for aromatic compounds. *J Bacteriol* **186**:1337-44.
98. **Morales, G., A. Ugidos, and F. Rojo.** 2006. Inactivation of the *Pseudomonas putida* cytochrome o ubiquinol oxidase leads to a significant change in the transcriptome and to increased expression of the CIO and *cbb3-1* terminal oxidases. *Environ Microbiol* **8**:1764-74.
99. **Moreno, R., P. Fonseca, and F. Rojo.** 2010. The Crc global regulator inhibits the *Pseudomonas putida* pWW0 toluene/xylene assimilation pathway by repressing the translation of regulatory and structural genes. *J Biol Chem* **285**:24412-9.
100. **Moreno, R., M. Martinez-Gomariz, L. Yuste, C. Gil, and F. Rojo.** 2009. The *Pseudomonas putida* Crc global regulator controls the hierarchical assimilation of amino acids in a complete medium: evidence from proteomic and genomic analyses. *Proteomics* **9**:2910-28.
101. **Moreno, R., S. Marzi, P. Romby, and F. Rojo.** 2009. The Crc global regulator binds to an unpaired A-rich motif at the *Pseudomonas putida* *alkS* mRNA coding sequence and inhibits translation initiation. *Nucleic Acids Res* **37**:7678-90.
102. **Moreno, R., and F. Rojo.** 2008. The target for the *Pseudomonas putida* Crc global regulator in the benzoate degradation pathway is the BenR transcriptional regulator. *J Bacteriol* **190**:1539-45.
103. **Moreno, R., A. Ruiz-Manzano, L. Yuste, and F. Rojo.** 2007. The *Pseudomonas putida* Crc global regulator is an RNA binding protein that

- inhibits translation of the AlkS transcriptional regulator. *Mol Microbiol* **64**:665-75.
104. **Moss, C. W., S. B. Samuels, and R. E. Weaver.** 1972. Cellular fatty acid composition of selected *Pseudomonas* species. *Appl Microbiol* **24**:596-8.
 105. **Mrozik, A., S. Labuzek, and Z. Piotrowska-Seget.** 2005. Changes in fatty acid composition in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas stutzeri* during naphthalene degradation. *Microbiol Res* **160**:149-57.
 106. **Munoz-Elias, E. J., A. M. Upton, J. Cherian, and J. D. McKinney.** 2006. Role of the methylcitrate cycle in *Mycobacterium tuberculosis* metabolism, intracellular growth, and virulence. *Mol Microbiol* **60**:1109-22.
 107. **Munoz-Rojas, J., P. Bernal, E. Duque, P. Godoy, A. Segura, and J. L. Ramos.** 2006. Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze-drying. *Appl Environ Microbiol* **72**:472-7.
 108. **Nelson, K. E., C. Weinl, I. T. Paulsen, R. J. Dodson, H. Hilbert, V. A. Martins dos Santos, D. E. Fouts, S. R. Gill, M. Pop, M. Holmes, L. Brinkac, M. Beanan, R. T. DeBoy, S. Daugherty, J. Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, O. White, J. Peterson, H. Khouiri, I. Hance, P. Chris Lee, E. Holtzapple, D. Scanlan, K. Tran, A. Moazzez, T. Utterback, M. Rizzo, K. Lee, D. Kosack, D. Moestl, H. Wedler, J. Lauber, D. Stjepandic, J. Hoheisel, M. Straetz, S. Heim, C. Kiewitz, J. A. Eisen, K. N. Timmis, A. Dusterhoft, B. Tummler, and C. M. Fraser.** 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* **4**:799-808.
 109. **Nickel, M., G. Homuth, C. Bohnisch, U. Mader, and T. Schweder.** 2004. Cold induction of the *Bacillus subtilis* bkd operon is mediated by increased mRNA stability. *Mol Genet Genomics* **272**:98-107.
 110. **Nishijyo, T., D. Haas, and Y. Itoh.** 2001. The CbrA-CbrB two-component regulatory system controls the utilization of multiple carbon and nitrogen sources in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **40**:917-31.
 111. **Nogales, J., B. O. Palsson, and I. Thiele.** 2008. A genome-scale metabolic reconstruction of *Pseudomonas putida* KT2440: iJN746 as a cell factory. *BMC Syst Biol* **2**:79.
 112. **Nudler, E., and M. E. Gottesman.** 2002. Transcription termination and anti-termination in *E. coli*. *Genes Cells* **7**:755-68.
 113. **Oliveros, J. C.** VENNY. Oliveros, J.C. (2007) VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.
 114. **Panoff, J. M., D. Corroler, B. Thammavongs, and P. Boutibonnes.** 1997. Differentiation between cold shock proteins and cold acclimation proteins in a mesophilic gram-positive bacterium, *Enterococcus faecalis* JH2-2. *J Bacteriol* **179**:4451-4.
 115. **Petruschka, L., G. Burchhardt, C. Muller, C. Weihe, and H. Herrmann.** 2001. The cyo operon of *Pseudomonas putida* is involved in carbon catabolite repression of phenol degradation. *Mol Genet Genomics* **266**:199-206.
 116. **Pfluger-Grau, K., and B. Gorke.** Regulatory roles of the bacterial nitrogen-related phosphotransferase system. *Trends Microbiol* **18**:205-14.
 117. **Phadtare, S.** 2004. Recent developments in bacterial cold-shock response. *Curr Issues Mol Biol* **6**:125-36.
 118. **Pieper, D. H., V. A. Martins dos Santos, and P. N. Golyshin.** 2004. Genomic and mechanistic insights into the biodegradation of organic pollutants. *Curr Opin Biotechnol* **15**:215-24.

119. **Poole, R. K., and G. M. Cook.** 2000. Redundancy of aerobic respiratory chains in bacteria? Routes, reasons and regulation. *Adv Microb Physiol* **43**:165-224.
120. **Prud'homme-Genereux, A., R. K. Beran, I. Iost, C. S. Ramey, G. A. Mackie, and R. W. Simons.** 2004. Physical and functional interactions among RNase E, polynucleotide phosphorylase and the cold-shock protein, CsdA: evidence for a 'cold shock degradosome'. *Mol Microbiol* **54**:1409-21.
121. **Puchalka, J., M. A. Oberhardt, M. Godinho, A. Bielecka, D. Regenhardt, K. N. Timmis, J. A. Papin, and V. A. Martins dos Santos.** 2008. Genome-scale reconstruction and analysis of the *Pseudomonas putida* KT2440 metabolic network facilitates applications in biotechnology. *PLoS Comput Biol* **4**:e1000210.
122. **Purusharth, R. I., F. Klein, S. Sulthana, S. Jager, M. V. Jagannadham, E. Evguenieva-Hackenberg, M. K. Ray, and G. Klug.** 2005. Exoribonuclease R interacts with endoribonuclease E and an RNA helicase in the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas syringae* Lz4W. *J Biol Chem* **280**:14572-8.
123. **Purusharth, R. I., B. Madhuri, and M. K. Ray.** 2007. Exoribonuclease R in *Pseudomonas syringae* is essential for growth at low temperature and plays a novel role in the 3' end processing of 16 and 5 S ribosomal RNA. *J Biol Chem* **282**:16267-77.
124. **Rainey, P. B.** 1999. Adaptation of *Pseudomonas fluorescens* to the plant rhizosphere. *Environ Microbiol* **1**:243-57.
125. **Rashid, M. H., and A. Kornberg.** 2000. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:4885-90.
126. **Regenhardt, D., H. Heuer, S. Heim, D. U. Fernandez, C. Strompl, E. R. Moore, and K. N. Timmis.** 2002. Pedigree and taxonomic credentials of *Pseudomonas putida* strain KT2440. *Environ Microbiol* **4**:912-5.
127. **Reva, O. N., C. Weinel, M. Weinel, K. Bohm, D. Stjepandic, J. D. Hoheisel, and B. Tummler.** 2006. Functional genomics of stress response in *Pseudomonas putida* KT2440. *J Bacteriol* **188**:4079-92.
128. **Richards, J., P. Mehta, and A. W. Karzai.** 2006. RNase R degrades non-stop mRNAs selectively in an SmpB-tmRNA-dependent manner. *Mol Microbiol* **62**:1700-12.
129. **Rojo, F.** 2010. Carbon catabolite repression in *Pseudomonas* : optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiol Rev* **34**:658-84.
130. **Rojo, F.** 2009. Degradation of alkanes by bacteria. *Environ Microbiol* **11**:2477-90.
131. **Rompf, A., C. Hungerer, T. Hoffmann, M. Lindenmeyer, U. Romling, U. Gross, M. O. Doss, H. Arai, Y. Igarashi, and D. Jahn.** 1998. Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* hemF and hemN by the dual action of the redox response regulators Anr and Dnr. *Mol Microbiol* **29**:985-97.
132. **Rottem, S., and L. Leive.** 1977. Effect of variations in lipopolysaccharide on the fluidity of the outer membrane of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **252**:2077-81.
133. **Ruiz-Manzano, A., L. Yuste, and F. Rojo.** 2005. Levels and activity of the *Pseudomonas putida* global regulatory protein Crc vary according to growth conditions. *J Bacteriol* **187**:3678-86.
134. **Sambrook, J., D. W. Russell.** 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
135. **Schiene, C., and G. Fischer.** 2000. Enzymes that catalyse the restructuring of proteins. *Curr Opin Struct Biol* **10**:40-5.

136. **Sezonov, G., D. Joseleau-Petit, and R. D'Ari.** 2007. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J Bacteriol* **189**:8746-9.
137. **Shivaji, S., and J. S. Prakash.** 2010. How do bacteria sense and respond to low temperature? *Arch Microbiol* **192**:85-95.
138. **Sinensky, M.** 1974. Homeoviscous adaptation--a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**:522-5.
139. **Soderberg, M. A., and N. P. Cianciotto.** 2010. Mediators of lipid A modification, RNA degradation, and central intermediary metabolism facilitate the growth of *Legionella pneumophila* at low temperatures. *Curr Microbiol* **60**:59-65.
140. **Sonnleitner, E., L. Abdou, and D. Haas.** 2009. Small RNA as global regulator of carbon catabolite repression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
141. **Strocchi, M., M. Ferrer, K. N. Timmis, and P. N. Golyshin.** 2006. Low temperature-induced systems failure in *Escherichia coli*: insights from rescue by cold-adapted chaperones. *Proteomics* **6**:193-206.
142. **Subramanian, C., C. O. Rock, and Y. M. Zhang.** DesT coordinates the expression of anaerobic and aerobic pathways for unsaturated fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **192**:280-5.
143. **Sugimoto, S., K. Saruwatari, C. Higashi, and K. Sonomoto.** 2008. The proper ratio of GrpE to DnaK is important for protein quality control by the DnaK-DnaJ-GrpE chaperone system and for cell division. *Microbiology* **154**:1876-85.
144. **Textor, S., V. F. Wendisch, A. A. De Graaf, U. Muller, M. I. Linder, D. Linder, and W. Buckel.** 1997. Propionate oxidation in *Escherichia coli*: evidence for operation of a methylcitrate cycle in bacteria. *Arch Microbiol* **168**:428-36.
145. **Thieringer, H. A., P. G. Jones, and M. Inouye.** 1998. Cold shock and adaptation. *Bioessays* **20**:49-57.
146. **Timmis, K. N.** 2002. *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. *Environ Microbiol* **4**:779-81.
147. **Tobe, T., C. Sasakawa, N. Okada, Y. Honma, and M. Yoshikawa.** 1992. *vacB*, a novel chromosomal gene required for expression of virulence genes on the large plasmid of *Shigella flexneri*. *J Bacteriol* **174**:6359-67.
148. **Tobes, R., and J. L. Ramos.** 2005. REP code: defining bacterial identity in extragenic space. *Environ Microbiol* **7**:225-8.
149. **Ugidos, A.** 2008. Regulación de la expresión de las oxidasas terminales de la cadena de transporte de electrones de *Pseudomonas putida* y su efecto en represión catabólica. Tesis Doctoral Universidad Autónoma de Madrid.
150. **Ugidos, A., G. Morales, E. Rial, H. D. Williams, and F. Rojo.** 2008. The coordinate regulation of multiple terminal oxidases by the *Pseudomonas putida* ANR global regulator. *Environ Microbiol* **10**:1690-702.
151. **Upton, A. M., and J. D. McKinney.** 2007. Role of the methylcitrate cycle in propionate metabolism and detoxification in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* **153**:3973-82.
152. **van der Rest, M. E., C. Frank, and D. Molenaar.** 2000. Functions of the membrane-associated and cytoplasmic malate dehydrogenases in the citric acid cycle of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **182**:6892-9.
153. **Vicente, M., and J. L. Canovas.** 1973. Glucolysis in *Pseudomonas putida*: physiological role of alternative routes from the analysis of defective mutants. *J Bacteriol* **116**:908-14.
154. **Vincent, H. A., and M. P. Deutscher.** 2009. Insights into how RNase R degrades structured RNA: analysis of the nuclease domain. *J Mol Biol* **387**:570-83.

155. **Vincent, H. A., and M. P. Deutscher.** 2006. Substrate recognition and catalysis by the exoribonuclease RNase R. *J Biol Chem* **281**:29769-75.
156. **Vincent, H. A., and M. P. Deutscher.** 2009. The Roles of Individual Domains of RNase R in Substrate Binding and Exoribonuclease Activity: THE NUCLEASE DOMAIN IS SUFFICIENT FOR DIGESTION OF STRUCTURED RNA. *J Biol Chem* **284**:486-94.
157. **Wackett, L. P.** 2003. *Pseudomonas putida*--a versatile biocatalyst. *Nat Biotechnol* **21**:136-8.
158. **Wang, F., X. Xiao, H. Y. Ou, and Y. Gai.** 2009. Role and regulation of fatty acid biosynthesis in the response of *Shewanella piezotolerans* WP3 to different temperatures and pressures. *J Bacteriol* **191**:2574-84.
159. **Waters, K. M., J. G. Pounds, and B. D. Thrall.** 2006. Data merging for integrated microarray and proteomic analysis. *Brief Funct Genomic Proteomic* **5**:261-72.
160. **White-Ziegler, C. A., S. Um, N. M. Perez, A. L. Berns, A. J. Malhowski, and S. Young.** 2008. Low temperature (23 degrees C) increases expression of biofilm-, cold-shock- and RpoS-dependent genes in *Escherichia coli* K-12. *Microbiology* **154**:148-66.
161. **Williams, H. D., J. E. Zlosnik, and B. Ryall.** 2007. Oxygen, cyanide and energy generation in the cystic fibrosis pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Adv Microb Physiol* **52**:1-71.
162. **Wolff, J. A., C. H. MacGregor, R. C. Eisenberg, and P. V. Phibbs, Jr.** 1991. Isolation and characterization of catabolite repression control mutants of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J Bacteriol* **173**:4700-6.
163. **www.pseudomonas.com.**
164. **Yang Si-Zong, J. H.-J., Wei Zhi, He Rui-Xia, Ji Yan-Jun, Li Xiu-Mei, Yu Shao-Peng** 2009. Bioremediation of oil spills in cold environments: a review. *Pedosphere* **19**:371-381.
165. **Yuste, L., I. Canosa, and F. Rojo.** 1998. Carbon-source-dependent expression of the PalkB promoter from the *Pseudomonas oleovorans* alkane degradation pathway. *J Bacteriol* **180**:5218-26.
166. **Yuste, L., A. B. Hervas, I. Canosa, R. Tobes, J. I. Jimenez, J. Nogales, M. M. Perez-Perez, E. Santero, E. Diaz, J. L. Ramos, V. de Lorenzo, and F. Rojo.** 2006. Growth phase-dependent expression of the *Pseudomonas putida* KT2440 transcriptional machinery analysed with a genome-wide DNA microarray. *Environ Microbiol* **8**:165-77.
167. **Yuste, L., and F. Rojo.** 2001. Role of the *crc* gene in catabolic repression of the *Pseudomonas putida* GPo1 alkane degradation pathway. *J Bacteriol* **183**:6197-206.
168. **Zangrossi, S., F. Briani, D. Ghisotti, M. E. Regonesi, P. Tortora, and G. Deho.** 2000. Transcriptional and post-transcriptional control of polynucleotide phosphorylase during cold acclimation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **36**:1470-80.
169. **Zhang, Y. M., and C. O. Rock.** 2008. Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **6**:222-33.
170. **Zhu, K., K. H. Choi, H. P. Schweizer, C. O. Rock, and Y. M. Zhang.** 2006. Two aerobic pathways for the formation of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **60**:260-73.

11 ANEXO I: INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

11.1 Tabla de datos de transcriptómica del mutante en la RNasa R comparado con KT2440

Tabla 12. Genes cuyos niveles de ARNs mensajeros son mayores o menores en una cepa deficiente en el gen *mnr* con respecto a la cepa silvestre. Los datos se obtuvieron utilizando *microarrays* y corresponden a células creciendo en fase exponencial en medio rico LB a 30°C. Sólo se indican aquellos genes que mostraron un cambio mayor o igual a dos veces (los valores positivos indican que el ARNm es más abundante en la cepa mutante que en la silvestre y los valores negativos indican que el ARNm es menos abundante) y un valor de *P* (corregido por FDR) <0,05. Los nombres de los genes corresponden a los indicados en "The Institute for Genomic Research" (<http://www.tigr.org>) con algunas modificaciones. Las abreviaturas utilizadas en la sección "categoría" son: BA: biosíntesis de aminoácidos; BC: biosíntesis de cofactores, grupos prostéticos y portadores; EC: envuelta celular; FD: función desconocida; ; FR: funciones reguladoras; MA: metabolismo del ADN; MAGF: metabolismo de ácidos grasos y fosfolípidos; MCI: metabolismo central intermediario; ME: metabolismo energético; OC: otras categorías; PC: procesos celulares; PH: proteínas hipotéticas; PP: procesamiento de proteínas; PPNN: purinas, pirimidinas, nucleósidos y nucleótidos; PTU: proteínas de transporte y unión; SP: síntesis de proteínas; T: transcripción. La presencia de secuencias REP o de un terminador de Transcripción (Term) se indican con el símbolo "+".

TIGR locus	Gen	Descripción	Categoría	REP	Term	Señal	Cambio	P-valor Corregido
PP_0965	<i>hisG</i>	ATP fosforribosiltransferasa	BA			10441	10,1	0,00013
PP_3721	<i>aspC</i>	aspartato aminotransferasa	BA			849	2,1	0,03593
PP_4680	<i>ilvB</i>	acetolactato sintasa subunidad grande tipo biosintética	BA			4545	2,5	0,03551
PP_5078	<i>aroB</i>	3-dehidroquinato sintasa	BA			843	2,0	0,04967

PP_5079	<i>aroK</i>	siquimato quinasa	BA			3517	3,4	0,00278
PP_5227	<i>lysA-2</i>	diaminopimelato descarboxilasa	BA			4804	2,5	0,04074
PP_0243	<i>gshA</i>	glutamato-cisteína ligasa	BC			3061	-2,0	0,02569
PP_0322	<i>glyA-1</i>	serina hidroximetiltransferasa	BC			1629	-2,1	0,01923
PP_0402	<i>pdxA</i>	proteína piridoxal fosfato PdxA	BC			1520	2,7	0,03090
PP_0519	<i>thiL</i>	tiamina monofosfato quinasa	BC			4771	5,4	0,00029
PP_0732	<i>hemA</i>	glutamyl-tRNA reductasa	BC			3822	2,0	0,04843
PP_1595	<i>uppS</i>	undecaprenil difosfato sintasa	BC			12331	13,8	0,00002
PP_1676	<i>cobC</i>	proteína biosíntesis cobalamina CobC	BC			1795	3,4	0,00280
PP_1997	<i>folC</i>	folilpoliglutamato sintetasa	BC			3795	3,1	0,01010
PP_2117	<i>pdxB</i>	eritronato-4-fosfato deshidrogenasa	BC			1510	2,8	0,03501
PP_2123	<i>moeA</i>	proteína de biosíntesis MoeA	BC			1168	2,4	0,02690
PP_3457	<i>mobA</i>	biosíntesis del dinucleótido molibdopterina-guanina	BC			4939	3,2	0,03983
PP_3506		quelatasa de magnesio, subunidad ChII	BC			729	2,3	0,03508
PP_3508	<i>cobW</i>	proteína de biosíntesis de cobalamina CobW	BC			2020	3,0	0,02095
PP_3999	<i>cobA-2</i>	uroporfirin-III C-metiltransferasa	BC			1510	4,7	0,00083
PP_4782	<i>thiD</i>	fosfometilpirimidina quinasa	BC			676	2,6	0,00840
PP_4783	<i>thiE</i>	tiamina-fosfato pirofosforilasa	BC			2402	2,4	0,00710
PP_4784	<i>hemL</i>	glutamato-1-semialdehído-2 1-aminomutasa	BC	+		5713	6,7	0,00011
PP_4828	<i>cobH</i>	precorrina-8X metilmutasa	BC			1243	2,3	0,01559

PP_4984	<i>bioA</i>	adenosilmetionina-8-amino-7-oxononanoato aminotransferasa	BC			393	2,3	0,04287
PP_5199	<i>ubiH</i>	2-octaprenil-6-metoxifenil hidroxilasa	BC			1663	4,1	0,00127
PP_5357	<i>pkxY</i>	piridoxal quinasa	BC			1458	5,5	0,01063
PP_0063		lauroil aciltransferasa, biosíntesis lípido A, probable	EC	+		2798	2,9	0,04412
PP_1331	<i>ftsI</i>	proteína de unión a penicilina 3	EC			3591	6,0	0,00059
PP_1338	<i>murC</i>	UDP-N-acetilmuramato-alanina ligasa	EC			3444	2,3	0,02170
PP_1601	<i>lpxD</i>	UDP-3-O-(3-hidroximiristoil) glucosamina N-aciltransferasa	EC			7591	3,9	0,03501
PP_1781		O-aciltransferasa, probable	EC			1541	2,1	0,03728
PP_4944		carbamoiltransferasa familia NodU	EC			898	2,5	0,01010
PP_0173		proteína emparentada factores con transcripcionales	FD			4705	2,3	0,01184
PP_0351		sensor transmembrana, probable	FD	+		2452	2,3	0,01846
PP_0500		proteína emparentada con dTDP-4-ramnosa reductasa	FD			3169	3,4	0,00553
PP_0690		proteína de unión de GTP, familia GTP1/Obg	FD		+	5673	3,2	0,00311
PP_1766		proteína familia factor iniciación 2	FD	+		4608	5,4	0,00013
PP_1824		proteína con dominio Smr	FD			969	2,4	0,02779
PP_2028		proteína con dominio TPR	FD			580	2,3	0,03469
PP_2146		familia helicasa SNF2/RAD54	FD	+		962	2,4	0,02418
PP_3157		proteína familia inositol monofosfatasa	FD	+		1121	2,9	0,01147

PP_3248		proteína familia peroxidasa tipo Dyp	FD			6165	2,7	0,00647
PP_4002		familia ATPasa AAA	FD			1121	2,3	0,04841
PP_4648		nucleótido metiltransferasa, probable	FD	+		885	2,9	0,01559
PP_5100		proteína Ham1	FD			7082	4,5	0,00615
PP_5182		aminotransferasa clase III	FD			787	2,5	0,03728
PP_5231		proteína familia dehalogenasa	FD		+	719	2,1	0,04765
PP_0270		sensor histidín-quinasa	FR			3350	3,7	0,01357
PP_0668		sensor transmembrana, probable	FR			2034	2,0	0,03593
PP_0779		transductor aceptor de metilos, quimiotaxis /proteína con caja sensora	FR			2226	3,6	0,00647
PP_1057		regulador transcripcional familia PadR	FR			1746	2,5	0,01169
PP_1387	<i>tgtR</i>	regulador transcripcional TgtR	FR			3236	5,0	0,00074
PP_1492		sensor histidín-quinasa /regulador de respuesta	FR			3104	2,6	0,02274
PP_1652		sensor histidín-quinasa	FR	+		1370	2,5	0,01438
PP_2097		proteína caja sensora	FR		+	1278	2,3	0,01374
PP_2547		regulador transcripcional familia LysR	FR			867	2,7	0,02933
PP_2832		regulador transcripcional familia LysR	FR			5293	4,3	0,03742
PP_3372	<i>cpxR</i>	regulador de respuesta de unión a ADN CpxR	FR			523	2,2	0,04765
PP_3576		sensor transmembrana, probable	FR			484	2,8	0,00932
PP_4167	<i>sixA</i>	fosfohistidina fosfatasa SixA	FR			1898	3,1	0,00405
PP_4265	<i>anr</i>	regulador transcripcional Anr	FR			8599	13,6	0,00034

PP_4607		sensor transmembrana, probable	FR	+		2574	3,8	0,00050
PP_4691	<i>sfsA</i>	proteína estimulación fermentación azúcares	FR			1046	2,2	0,04052
PP_4781		sensor histidín-quinasa	FR			6794	2,0	0,02817
PP_4966		regulador transcripcional familia ArsR	FR			4804	4,6	0,00027
PP_1435	<i>recO</i>	proteína de reparación de ADN RecO	MA			923	2,0	0,00273
PP_1626	<i>mutS</i>	proteína reparación de emparejamientos erróneos MutS	MA			2610	3,5	0,01558
PP_1773	<i>ihfB</i>	factor de integración del hospedador subunidad beta	MA			4153	-2,1	0,04967
PP_2139	<i>topA</i>	ADN topoisomerasa I	MA		+	1872	3,7	0,00121
PP_2393	<i>polB</i>	ADN polimerasa II	MA			1053	2,9	0,01029
PP_2471	<i>ihfA</i>	factor de integración del hospedador subunidad alfa	MA			15936	2,4	0,01357
PP_5088	<i>priA</i>	proteína primosomal N'	MA			1067	4,1	0,00511
PP_5230	<i>xerC</i>	integrasa/recombinasa XerC	MA			1113	3,4	0,01347
PP_5352	<i>uvrD</i>	ADN helicasa II	MA			1951	2,7	0,01717
PP_0154		proteína familia acetil-CoA hidrolasas/transferasas	MAGF			1218	-2,2	0,01313
PP_0892		proteína familia fosfolipasas	MAGF			755	3,2	0,02372
PP_1621	<i>fabZ</i>	L-isoaspartato O-metiltransferasa	MAGF			1885	2,1	0,04606
PP_4545		3-oxoacil-(proteína portadora de acilo) sintasa III, probable	MAGF	+		1846	3,5	0,00615
PP_0844	<i>iscA</i>	proteína de unión de hierro IscA	MCI			16728	4,0	0,00028
PP_0545		aldeido deshidrogenasa	ME	+		2150	-2,1	0,02095

PP_0552	<i>adh</i>	2,3-butanodiol deshidrogenasa	ME			7804	-2,2	0,01757
PP_2082	<i>ppsA</i>	fosfoenolpiruvato sintasa	ME		+	2288	2,2	0,01627
PP_2453	<i>ansA</i>	L-asparaginasa II	ME			1243	-2,0	0,04189
PP_3416	<i>gnuK</i>	gluconoquinasa	ME			2896	-2,1	0,01765
PP_4042	<i>zwf-2</i>	glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa	ME			969	2,5	0,02933
PP_4125	<i>nuoH</i>	NADH deshidrogenasa I subunidad H	ME			3848	2,7	0,01108
PP_4129	<i>nuoL</i>	NADH deshidrogenasa I subunidad L	ME			9216	2,3	0,02933
PP_4190	<i>sdhB</i>	succinato deshidrogenasa (hierro-azufre)	ME			5008	2,7	0,03915
PP_4646		ferredoxina-NADP+ reductasa, probable	ME			898	4,6	0,01144
PP_4960	<i>fda</i>	fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa	ME		+	949	2,3	0,01717
PP_5032	<i>hutH</i>	histidina amonio-liasa	ME	+		622	3,9	0,01763
PP_5270	<i>dadA-2</i>	D-aminoácido deshidrogenasa, subunidad pequeña	ME			3616	2,2	0,02466
PP_5414	<i>atpG</i>	ATP sintasa F1, subunidad gamma	ME			1201	2,0	0,03728
PP_5416	<i>atpH</i>	ATP sintasa F1, subunidad delta	ME			17560	3,3	0,04032
PP_5418	<i>atpE</i>	ATP sintasa F0, subunidad C	ME			4300	3,0	0,01841
PP_1562		terminasa de fago, subunidad pequeña, probable	OC			505	-2,6	0,01604
PP_4745		ISPP_u15 transposasa Orf2	OC			6794	2,0	0,03728
PP_0964	<i>murA</i>	UDP-N-acetilglucosamina carboxiviniltransferasa	PC			3327	2,7	0,01745
PP_1210		proteína de estrés, unión a ADN, probable	PC			3902	-2,1	0,03531
PP_1341	<i>ftsA</i>	proteína de división celular FtsA	PC			3929	2,3	0,01617

PP_2648		familia de proteínas de estrés universal	PC			4012	-2,8	0,04274
PP_4276		proteína SMC de segregación del cromosoma	PC			1351	2,6	0,00833
PP_4333		proteína con dominio CheW	PC			1808	2,0	0,03545
PP_4335	<i>motB</i>	proteína de motor flagelar MotB	PC	+		1252	3,3	0,00315
PP_4341	<i>fliA</i>	factor sigma de biosíntesis flagelar FliA	PC			4771	2,1	0,03915
PP_4343	<i>flhF</i>	proteína de biosíntesis flagelar FlhF	PC			1235	3,7	0,00129
PP_4352	<i>flhB</i>	proteína de biosíntesis flagelar FlhB	PC			2978	3,2	0,00168
PP_4353	<i>fliR</i>	proteína de biosíntesis flagelar FliR	PC			936	2,4	0,04868
PP_4361	<i>fliK</i>	proteína de flagelar FliK, control tamaño gancho	PC			1226	2,7	0,00687
PP_4370	<i>fliE</i>	proteína flagellar FliE, gancho del complejo basal	PC			2091	2,3	0,04967
PP_4371	<i>fleR</i>	regulador de respuesta FleR	PC			719	2,2	0,03915
PP_4382	<i>flgJ</i>	peptidoglicano hidrolasa FlgJ	PC			1510	3,1	0,00417
PP_4386	<i>flgF</i>	proteína flagelar FlgF, vara central del cuerpo basal	PC			1389	2,1	0,04340
PP_4394	<i>flgA</i>	proteína flagelar FlgA, formación anillo P cuerpo basal	PC			2539	2,7	0,00756
PP_4987		proteína de quimiotaxis, probable	PC			1184	3,5	0,00487
PP_0122		proteína hipotética	PH			2837	-2,3	0,02524
PP_0138		proteína hipotética	PH			5257	3,1	0,00765
PP_0434		proteína hipotética	PH		+	7968	10,3	0,00004
PP_0695		proteína hipotética	PH			3148	4,1	0,00284

Información suplementaria

PP_0837		proteína hipotética	PH	+		5914	2,9	0,03961
PP_0855		proteína hipotética	PH			2353	2,1	0,03915
PP_0862		proteína hipotética	PH			2419	4,0	0,00094
PP_1020		proteína hipotética	PH			3350	3,3	0,02511
PP_1134		proteína hipotética	PH	+		2336	2,2	0,01193
PP_1514		proteína hipotética	PH			3444	-2,4	0,02732
PP_1822		proteína hipotética	PH			1128	2,2	0,03090
PP_2631		proteína hipotética	PH			879	3,2	0,00986
PP_2633		proteína hipotética	PH			787	2,9	0,00687
PP_2854		proteína hipotética	PH			781	2,5	0,01558
PP_2883		proteína hipotética	PH			949	2,1	0,03593
PP_3035		proteína hipotética	PH		+	1687	-2,5	0,03728
PP_3098		proteína hipotética	PH			690	2,9	0,00681
PP_3118		proteína hipotética	PH			1031	2,8	0,02472
PP_3160		proteína hipotética	PH			553	-2,2	0,02463
PP_3171		proteína hipotética	PH			1698	2,6	0,00704
PP_3207		proteína hipotética	PH			446	2,9	0,03452
PP_3530		proteína hipotética	PH		+	2978	-2,2	0,01424
PP_3827		proteína hipotética	PH			2369	5,6	0,00035
PP_3913		proteína hipotética	PH			1629	2,1	0,04026

PP_4114		proteína hipotética	PH			671	2,3	0,02175
PP_4314		proteína hipotética	PH			1563	2,8	0,00394
PP_4397		proteína hipotética	PH	+	+	671	3,0	0,00594
PP_4520		proteína hipotética	PH			1687	3,5	0,03274
PP_4671		proteína hipotética	PH			1448	3,7	0,00140
PP_4808		proteína hipotética	PH			8192	8,9	0,00054
PP_4910		proteína hipotética	PH			1758	11,3	0,00014
PP_4914		proteína hipotética	PH			1003	2,0	0,03983
PP_4939		proteína hipotética	PH			744	2,3	0,04053
PP_4940		proteína hipotética	PH			613	2,4	0,03700
PP_4942		proteína hipotética	PH			676	2,2	0,04246
PP_4996		proteína hipotética	PH			1128	3,6	0,00130
PP_5103		proteína hipotética	PH	+	+	2610	3,2	0,03953
PP_5113		proteína hipotética	PH			690	2,5	0,01223
PP_5160		proteína hipotética	PH			2106	2,2	0,02474
PP_5229		proteína hipotética	PH			1053	2,5	0,03173
PP_5316		proteína hipotética	PH			452	2,3	0,03763
PP_0604	<i>lspA</i>	lipoproteína peptidasa señal	PP			4905	2,1	0,03551
PP_1432	<i>lepB</i>	peptidasa señal I	PP			4211	2,3	0,03337
PP_2017	<i>pepN</i>	aminopeptidasa N	PP			1820	2,1	0,02418

PP_3045		proteasa CIPP, probable	PP			5078	-2,0	0,04754
PP_1664	<i>purN</i>	fosforribosilglicinamida formiltransferasa	PPNN			1184	3,6	0,01010
PP_3189	<i>codA</i>	citosa deaminasa	PPNN			1193	2,8	0,04287
PP_5336	<i>purE</i>	fosforribosilaminoimidazol carboxilasa, subunidad catalítica	PPNN			3492	2,3	0,03551
PP_0232	<i>tauB</i>	transportador ABC taurina, proteína de unión de ATP	PTU			955	-2,0	0,03590
PP_0861		receptor sideróforo de hierro de membrana externa	PTU	+	+	1252	2,7	0,01885
PP_0885		transportador ABC de dipéptidos, proteína periplásmica unión dipéptidos	PTU			1269	-2,3	0,02095
PP_1002	<i>arcD</i>	antiportador arginina/ornitina	PTU			2937	-2,3	0,02701
PP_1206	<i>oprD</i>	porina D	PTU		+	5793	-2,7	0,00394
PP_1220	<i>tolR</i>	proteína de transporte de biopolímeros TolR	PTU			3492	2,1	0,01601
PP_1297	<i>aapJ</i>	transportador general de aminoácidos ABC, proteína periplásmica de unión	PTU	+		1152	-2,2	0,01611
PP_1300	<i>aapP</i>	transportador general de aminoácidos, proteína de unión de ATP	PTU		+	560	-2,1	0,03456
PP_1384	<i>ttgC</i>	proteína de membrana externa TtgC (bomba de expulsión, familia RND)	PTU	+	+	2876	2,1	0,03983
PP_2418		proteína periplásmica de unión de hierro (transportador ABC)	PTU			662	3,4	0,01482
PP_2936		transportador ABC, proteína de unión de ATP	PTU	+		798	2,2	0,01735
PP_3456		bomba de expulsión, familia RND	PTU		+	7697	3,2	0,01071
PP_3652		transportador familia LysE	PTU			744	2,1	0,03915

PP_4147		proteína periplásmica de unión de péptidos (transportador ABC de péptidos)	PTU			1160	5,4	0,00013
PP_4261		transportador de cationes tipo P, ATPasa	PTU			2837	5,4	0,04052
PP_4282		aquaporina Z	PTU			2165	7,1	0,00394
PP_4483		transportador ABC de aminoácidos básicos, proteína de unión de ATP	PTU			1734	2,3	0,01717
PP_4507		proteína de incorporación de potasio, familia TrkH	PTU			9153	13,6	0,00002
PP_5023		transportador ABC de aminoácidos, permeasa	PTU			3350	4,0	0,00054
PP_5169	<i>cysW</i>	transportador ABC de sulfato, permeasa	PTU			962	3,0	0,00466
PP_5206		proteína de fusión de membrana	PTU			1489	4,1	0,03452
PP_5308	<i>tonB</i>	transporte de hierro, proteína periplásmica de unión	PTU			8192	7,6	0,00008
PP_0854	<i>hisS</i>	histidil-tRNA sintetasa	SP			2304	2,2	0,02176
PP_0930	<i>gatB</i>	glutamil-tRNA(Gln) amidotransferasa, subunidad beta	SP	+		1808	-2,3	0,04967
PP_0977	<i>valS</i>	valil-tRNA sintetasa	SP			2684	2,1	0,04730
PP_1315	<i>rplM</i>	proteína ribosomal L13	SP			25006	3,1	0,03915
PP_2465	<i>thrS</i>	treonil-tRNA sintetasa	SP			4608	-2,6	0,00756
PP_2469	<i>pheS</i>	fenilalanil-tRNA sintetasa, subunidad alfa	SP			8023	-2,1	0,01765
PP_4709	<i>rpsO</i>	proteína ribosomal S15	SP			5673	2,6	0,01029
PP_4877	<i>rpsF</i>	proteína ribosomal S6	SP			2610	2,1	0,04297
PP_4890		histidil-tRNA sintetasa, probable	SP			1351	5,1	0,00346
PP_5281	<i>rpmG</i>	proteína ribosomal L33	SP		+	1596	2,4	0,04348

Información suplementaria

PP_4608		factor sigma de la RNA polimerasa, subfamilia ECF	T			1105	2,9	0,01108
PP_4980		RNA helicasa ATP-dependiente, familia caja DEAD	T			739	2,2	0,04567
PP_5303		endoribonucleasa	T			1618	-2,2	0,04765

11.2 Tabla de datos de transcriptómica del crecimiento a 10°C comparado con 30°C

Tabla 13. Genes cuyos niveles de ARNm aumentan o disminuyen a 10°C con respecto a 30°C, según los resultados obtenidos con los *microarrays*. Sólo se indican aquellos genes cuyos niveles de ARNm cambian al menos dos veces, con un valor de $P < 0,05$ (corregido por FDR). Los valores positivos indican una mayor expresión a 10°C que a 30°C, y los negativos niveles de ARNm menores a 10°C (inverso del *fold change*). Las abreviaturas utilizadas en la columna "categoría" son: BA: biosíntesis de aminoácidos; BC: biosíntesis de cofactores, grupos prostéticos y portadores; EC: envuelta celular; FD: función desconocida; ; FR: funciones reguladoras; MA: metabolismo del ADN; MAGF: metabolismo de ácidos grasos y fosfolípidos; MCI: metabolismo central intermediario; ME: metabolismo energético; OC: otras categorías; PC: procesos celulares; PH: proteínas hipotéticas; PP: procesamiento de proteínas; PPNN: purinas, pirimidinas, nucleósidos y nucleótidos; PTU: proteínas de transporte y unión; SP: síntesis de proteínas; T: transcripción.

TIGR-locus	Gen	Descripción	Categoría	Cambio	FDR (LiMMA)
PP_2324	<i>aroF-1</i>	fosfo-2-dehidro-3-desoxiheptonato aldolasa clase I	BA	2,4	0,00628
PP_3781		familia Coproporfirinógeno III oxidasa, oxígeno-independiente	BC	3,2	0,00605
PP_4264	<i>hemN</i>	coproporfirinógeno III oxidasa	BC	-11,9	0,00055
PP_4597	<i>moaA</i>	biosíntesis de cofactor de molibdeno, proteína A	BC	-2,1	0,00976
PP_4868	<i>pncB</i>	nicotinato fosforibosiltransferasa	BC	2,0	0,01928
PP_0168	<i>lapA</i>	proteína de adhesión a superficies LapA	EC	-2,5	0,00329
PP_1185	<i>oprH</i>	proteína de membrana externa H1	EC	-11,7	0,00002
PP_1249		lipoproteína, probable	EC	-4,7	0,00050
PP_3821	<i>galU</i>	UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa	EC	2,2	0,00646

PP_4115		secretina de pili tipo IV PilQ, probable	EC	-2,3	0,00543
PP_5269	<i>dadX</i>	alanina racemasa, catabólica	EC	2,8	0,00749
PP_1669		proteína familia NLP/P60	FD	2,4	0,00543
PP_2486		flavin oxidorreductasa NADH-dependiente, familia Oye	FD	-2,2	0,00780
PP_2912		proteín-quinasa, probable	FD	3,1	0,00164
PP_3248		proteína familia peroxidasa tipo Dyp	FD	-3,1	0,00254
PP_3437		proteína dominio CBS	FD	-2,4	0,00638
PP_3547		oxidorreductasa, familia deshidrogenasas/reductasas de cadena corta	FD	-2,0	0,04232
PP_3925		proteína familia enzima fosfotransferasas	FD	2,3	0,01448
PP_4813		proteína familia PAP2 / proteína familia DedA	FD	-2,1	0,01609
PP_5092		proteína familia NLP/P60	FD	4,1	0,00050
PP_5218		proteína familia DedA	FD	2,3	0,02241
PP_5278		aldehido deshidrogenasa	FD	2,7	0,01521
PP_0298		regulador transcripcional familia AraC	FR	3,0	0,00298
PP_0807		regulador transcripcional dependiente de sigma-54	FR	-5,3	0,00019
PP_0841		regulador transcripcional familia BadM/Rrf2	FR	2,0	0,01024
PP_1186	<i>phoP</i>	proteína reguladora transcripcional PhoP	FR	-5,6	0,00044
PP_1187	<i>phoQ</i>	proteína sensora PhoQ	FR	-2,7	0,00453
PP_1313		regulador transcripcional familia AraC	FR	2,6	0,00801
PP_2333		regulador transcripcional familia GntR	FR	3,1	0,00550

PP_2457	<i>rbsR</i>	represor del operón de ribosa	FR	2,8	0,04423
PP_3552		sensor histidin-quinasa, dominio PAS/PAC	FR	2,6	0,00903
PP_3592		regulador transcripcional familia RpiR	FR	4,5	0,00068
PP_3756		regulador transcripcional familia TetR	FR	3,7	0,00055
PP_4515		regulador transcripcional familia MarR	FR	-2,1	0,01389
PP_5047	<i>ntrB</i>	caja sensora histidin quinasa NtrB	FR	-2,4	0,02292
PP_5048	<i>ntrC</i>	regulador de respuesta de dos componentes NtrC	FR	-3,4	0,01209
PP_2143	<i>lexA-1</i>	represor LexA	MA	2,1	0,01275
PP_4741	<i>hsMD</i>	sistema de restricción-modificación tipo I, subunidad M	MA	-2,1	0,01097
PP_4919		proteína familia MutT/nudix, hidrolasa NUDIX	MA	2,0	0,01620
PP_2136	<i>fadB</i>	complejo de oxidación de ácidos grasos, subunidad alfa	MAGF	2,1	0,01923
PP_3553		Acil-CoA sintetasa	MAGF	18,7	0,00152
PP_3554		proteína familia acil-CoA deshidrogenasa	MAGF	5,2	0,01209
PP_3754		beta-cetotiolasa	MAGF	4,8	0,00032
PP_3755	<i>paaH</i>	3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa	MAGF	12,0	0,00033
PP_3926		oxidorreductasa, familia deshidrogenasas/reductasas de cadena corta	MAGF	2,5	0,01567
PP_4063		ligasa de ácidos grasos de cadena larga-CoA, probable	MAGF	3,3	0,00931
PP_4549	<i>fadD</i>	ligasa de ácidos grasos cadena larga-CoA	MAGF	2,5	0,00473
PP_5347	<i>accC-2</i>	piruvato carboxilasa	MCI	-2,7	0,00550
PP_0596		beta-alanina-piruvato transaminasa	ME	2,5	0,01735

PP_1011	<i>glk</i>	glucoquinasa	ME	2,0	0,01253
PP_1024	<i>eda</i>	2-dehidro-3-desoxifosfogluconato aldolasa/4-hidroxi-2-oxoglutarato aldolasa	ME	2,0	0,02543
PP_1073	<i>glpD</i>	glicerol-3-fosfato deshidrogenasa	ME	-3,1	0,00134
PP_1157		acetolactato sintasa, catabólica, probable	ME	-2,9	0,00550
PP_1251	<i>mgo-2</i>	malato:quinona oxidorreductasa	ME	-2,4	0,03319
PP_1362	<i>pykA</i>	piruvato quinasa II	ME	2,2	0,00720
PP_1389		carboxifosfoenolpiruvato fosfonomutasa, probable	ME	-2,4	0,00477
PP_1972	<i>tyrB-1</i>	aminotransferasa de aminoácidos aromáticos	ME	-2,9	0,00281
PP_2149	<i>gap-2</i>	gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa	ME	-2,2	0,00771
PP_2334	<i>prpB</i>	2-metilisocitrato liasa	ME	2,9	0,00793
PP_2335	<i>prpC</i>	metilcitrato sintasa, probable	ME	5,5	0,00801
PP_2336		2-metilisocitrato hidratasa	ME	4,0	0,02953
PP_2337		proteína accesoria 2-metilisocitrato hidratasa, probable	ME	2,6	0,02513
PP_3365		acetolactato sintasa, catabólica, probable	ME	-4,6	0,00307
PP_3383	<i>gadB</i>	gluconato 2-deshidrogenasa, subunidad aceptora	ME	2,4	0,00605
PP_3384		gluconato 2-deshidrogenasa, subunidad aceptora	ME	2,9	0,00257
PP_3416	<i>gnuK</i>	gluconoquinasa	ME	5,7	0,00196
PP_3433	<i>hpd</i>	4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa	ME	4,6	0,00069
PP_3443		gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, probable	ME	4,5	0,00067
PP_3596		proteína familia D-aminoácido deshidrogenasa, subunidad	ME	4,5	0,01195

		pequeña			
PP_3662		proteína familia descarboxilasas	ME	2,7	0,00515
PP_3745	<i>glcD</i>	glicolato oxidasa, subunidad GlcD	ME	5,2	0,00108
PP_3747	<i>glcF</i>	glicolato oxidasa, subunidad hierro-azufre	ME	2,6	0,03911
PP_3839		alcohol deshidrogenasa dependiente de zinc	ME	-7,7	0,00050
PP_4012		isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP	ME	2,2	0,00756
PP_4064	<i>liuA</i>	isovaleril-CoA deshidrogenasa	ME	3,7	0,01543
PP_4065	<i>liuB</i>	3-metilcrotonil-CoA carboxilasa, subunidad beta	ME	3,9	0,00522
PP_4066	<i>liuC</i>	metilglutaconil-CoA hidratasa	ME	4,0	0,00574
PP_4067	<i>liuD</i>	acetil-CoA carboxilasa, biotina carboxilasa	ME	4,0	0,00857
PP_4124	<i>nuoG</i>	NADH deshidrogenasa, subunidad G	ME	-2,1	0,01066
PP_4125	<i>nuoH</i>	NADH deshidrogenasa, subunidad H	ME	-2,2	0,00779
PP_4127	<i>nuoJ</i>	NADH deshidrogenasa, subunidad J	ME	-2,1	0,00958
PP_4131	<i>nuoN</i>	NADH deshidrogenasa, subunidad N	ME	-2,1	0,00960
PP_4194	<i>gltA</i>	citrato sintasa	ME	2,1	0,00801
PP_4250	<i>ccoN-1</i>	citocromo c oxidasa tipo cbb3, subunidad I	ME	-5,7	0,03355
PP_4252	<i>ccoQ-1</i>	citocromo c oxidasa tipo cbb3, subunidad CcoQ	ME	-3,3	0,00450
PP_4253	<i>ccoP-1</i>	citocromo c oxidasa tipo cbb3, subunidad III	ME	-2,1	0,01636
PP_4259		proteína accesoria citocromo c oxidasa	ME	-2,8	0,00828
PP_4401	<i>bkdA1</i>	2-oxoisovalerato deshidrogenasa, subunidad alfa	ME	4,9	0,00068

PP_4402	<i>bkdA2</i>	2-oxoisovalerato deshidrogenasa, subunidad beta	ME	10,9	0,00164
PP_4403	<i>bkdB</i>	2-oxoisovalerato deshidrogenasa, componente lipoamida aciltransferasa	ME	7,0	0,00543
PP_4404	<i>lpdV</i>	2-oxoisovalerato deshidrogenasa, componente lipoamida deshidrogenasa	ME	3,8	0,03073
PP_4487	<i>acsA</i>	acetil-coA sintetasa	ME	4,1	0,03699
PP_4490	<i>phhA</i>	fenilalanina-4-hidroxilasa	ME	2,3	0,04240
PP_4491	<i>phhB</i>	pterina-4-alfa-carbinolamina deshidratasa	ME	4,1	0,00736
PP_4493		glicolato oxidasa, subunidad GlcD, probable	ME	-2,7	0,00364
PP_4547		glutamina sintetasa, probable	ME	2,0	0,04025
PP_4570		Aspartil/Asparaginil beta-hidrolasa, probable	ME	-2,6	0,00418
PP_4870		azurina	ME	-2,5	0,00453
PP_4947	<i>putA</i>	prolina deshidrogenasa/delta-1-pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa	ME	2,6	0,00793
PP_5046	<i>glnA</i>	glutamina sintetasa tipo I	ME	-2,7	0,00503
PP_5056	<i>pgm</i>	fosfoglicerato mutasa 2,3-bifosfoglicerato-independiente	ME	-2,2	0,00857
PP_5150	<i>rpiA</i>	ribosa 5-fosfato isomerasa	ME	-2,3	0,01127
PP_5267		citocromo c5	ME	-4,3	0,00216
PP_4745		ISPpu15, transposasa Orf2	OC	-2,0	0,01097
PP_5405		transposasa, proteína emparentada con TnsB	OC	-2,0	0,02213
PP_1209		proteína dominio familia choque frío	PC	-7,6	0,00009
PP_1819		transductor quimiotaxis aceptora de metilos	PC	2,1	0,01366

PP_2439	<i>ahpC</i>	alquil hidroperóxido reductasa, subunidad C	PC	-2,4	0,00663
PP_2487		betaína aldehído deshidrogenasa, probable	PC	-2,3	0,01125
PP_2648		familia de proteínas de estrés universal	PC	-6,1	0,00045
PP_3444		glioxalasa/dioxigenasa, proteína de resistencia a bleomicina	PC	3,9	0,00050
PP_3509		glioxalasa, proteína de resistencia a bleomicina	PC	2,6	0,00778
PP_4104		proteína familia glutatión S-transferasas	PC	2,2	0,00917
PP_4641	<i>cstA</i>	proteína de ayuno de carbono CstA	PC	2,2	0,01135
PP_5090		proteína división celular FtsN, probable	PC	-2,2	0,00801
PP_0153		proteína hipotética	PH	-2,5	0,01185
PP_1149		proteína hipotética	PH	-9,6	0,00006
PP_1233		proteína hipotética	PH	-2,3	0,00646
PP_1742		proteína hipotética	PH	7,3	0,00196
PP_2099		proteína hipotética	PH	2,6	0,00298
PP_2550		proteína hipotética	PH	-2,3	0,01409
PP_2644		proteína hipotética	PH	2,5	0,01245
PP_2874		proteína hipotética	PH	-3,0	0,00307
PP_3418		proteína hipotética	PH	5,3	0,00173
PP_3434		proteína hipotética	PH	3,2	0,00100
PP_3504		proteína hipotética	PH	-4,8	0,00050
PP_3610		proteína hipotética	PH	-2,3	0,00576

Información suplementaria

PP_3749		proteína hipotética	PH	2,0	0,02937
PP_3780		proteína hipotética	PH	7,0	0,00050
PP_3782		proteína hipotética	PH	3,7	0,00515
PP_4087		proteína hipotética	PH	2,0	0,01075
PP_4163		proteína hipotética	PH	2,2	0,00917
PP_4249		proteína hipotética	PH	-2,2	0,02937
PP_4291		proteína hipotética	PH	-2,2	0,00738
PP_4292		proteína hipotética	PH	-3,3	0,00091
PP_4293		proteína hipotética	PH	-2,5	0,00307
PP_4640		proteína hipotética	PH	2,3	0,01695
PP_5232		proteína hipotética	PH	-6,9	0,00008
PP_5279		proteína hipotética	PH	3,6	0,00329
PP_5391		proteína hipotética	PH	-2,2	0,02905
PP_5392		proteína hipotética	PH	-14,2	0,00006
PP_5395		proteína hipotética	PH	-2,4	0,00472
PP_0308		dipeptidasa, probable	PP	2,2	0,03959
PP_2206		peptidasa, familia U32	PP	-2,8	0,00535
PP_3316		ATPasa con actividad chaperona, probable	PP	2,0	0,03005
PP_4179	<i>htpG</i>	proteína de golpe térmico HtpG 90	PP	-3,4	0,00254
PP_4280		XdhC, factor accesorio xantina deshidrogenasa, probable	PP	2,1	0,01648

PP_4727	<i>dnaK</i>	chaperona molecular DnaK	PP	-2,3	0,00548
PP_4728	<i>grpE</i>	proteína golpe térmico GrpE	PP	-2,1	0,02547
PP_4849		proteína familia DnaK, probable	PP	-2,1	0,04392
PP_5265	<i>xpt</i>	xantina fosforribosiltransferasa	PPNN	-2,8	0,00778
PP_0178		Bomba de expulsión, proteína de fusión a membrana, probable	PTU	-2,2	0,02107
PP_0504	<i>oprG</i>	proteína de membrana externa OprG	PTU	-17,7	0,00002
PP_0799		porina, probable	PTU	-2,5	0,00397
PP_0868		transportador ABC de glicina betaína/carnitina/colina, proteína de unión de ATP, probable	PTU	2,8	0,00312
PP_0869		transportador ABC de glicina betaína/carnitina/colina, permeasa, probable	PTU	2,0	0,01071
PP_0870		región de unión sustrato del sistema de transporte ABC de glicina betaína	PTU	2,1	0,01075
PP_0871		transportador ABC de glicina betaína/carnitina/colina, proteína permeasa, probable	PTU	2,5	0,00977
PP_0882	<i>dppA</i>	transportador ABC de dipéptidos, proteína periplásmica de unión dipéptidos	PTU	2,8	0,01983
PP_0883	<i>opdP</i>	porina OpdP, probable	PTU	3,1	0,00550
PP_0885		transportador ABC de dipéptidos, proteína periplásmica de unión dipéptidos	PTU	5,2	0,00241
PP_1015	<i>gtsA</i>	transportador ABC de azúcares, proteína periplásmica de unión de sustrato	PTU	4,2	0,00232
PP_1016	<i>gtsB</i>	transportador ABC de azúcares, permeasa	PTU	2,5	0,01485
PP_1017	<i>gtsC</i>	transportador ABC de azúcares, permeasa	PTU	3,7	0,01125
PP_1018	<i>gtsD</i>	transportador ABC de azúcares, subunidad de unión de ATP	PTU	3,0	0,02034

PP_1019	<i>oprB-1</i>	porina B	PTU	3,2	0,02634
PP_1059		permeasa de aminoácidos	PTU	4,9	0,00050
PP_1068	<i>aatP</i>	transportador ABC de aminoácidos, proteína de unión de ATP	PTU	5,6	0,00453
PP_1069	<i>aatM</i>	transportador ABC de aminoácidos, permeasa	PTU	4,3	0,00488
PP_1070	<i>aatQ</i>	transportador ABC de aminoácidos, permeasa	PTU	4,9	0,00310
PP_1071	<i>aatJ</i>	transportador ABC de aminoácidos, proteína periplásmica de unión de aminoácidos	PTU	4,3	0,00263
PP_1138	<i>braF</i>	transportador ABC de aminoácidos ramificados, proteína de unión de ATP	PTU	2,7	0,01468
PP_1139	<i>braE</i>	proteína de transporte de aminoácidos ramificados de alta afinidad	PTU	2,2	0,01358
PP_1140	<i>braD</i>	transportador ABC de aminoácidos ramificados, proteína permeasa	PTU	3,2	0,00173
PP_1141	<i>braC</i>	transportador ABC de aminoácidos ramificados, proteína periplásmica de unión de aminoácidos	PTU	3,9	0,01286
PP_1188	<i>dctA</i>	proteína de transporte de C4-dicarboxilatos	PTU	-2,7	0,01358
PP_1206	<i>oprD</i>	porina D	PTU	4,2	0,00298
PP_1297	<i>aapJ</i>	transportador ABC general de aminoácidos, proteína periplásmica de unión	PTU	2,1	0,03163
PP_1400		transportador MFS de dicarboxilatos	PTU	2,4	0,01166
PP_1689		transportador de ácidos grasos de cadena larga, probable	PTU	2,2	0,02036
PP_1743		simportador de la familia sodio:soluto	PTU	6,3	0,00563
PP_2454	<i>rbsB</i>	transportador ABC de ribosa, proteína periplásmica de unión de ribosa	PTU	3,8	0,00550
PP_2455	<i>rbsA</i>	transportador ABC de ribosa, proteína unión ATP	PTU	2,9	0,02592

PP_3176		transportador de la familia MSF	PTU	10,8	0,00024
PP_3368		transportador de la familia MSF	PTU	-3,3	0,00397
PP_3417	<i>gntP</i>	transportador de gluconato	PTU	5,6	0,00044
PP_3593		transportador ABC de aminoácidos, proteína periplásmica de unión de aminoácidos	PTU	6,0	0,00216
PP_3594		transportador ABC de aminoácidos, proteína permeasa	PTU	2,3	0,05056
PP_3597		transportador ABC de aminoácidos, proteína unión ATP	PTU	3,1	0,01543
PP_3764		porina, probable	PTU	-2,1	0,01555
PP_4103		transportador de fosfato inorgánico de baja afinidad	PTU	-2,6	0,00298
PP_4184	<i>braZ</i>	sistema III de transporte de aminoácidos ramificados proteína portadora	PTU	2,1	0,01127
PP_4653		permeasa de xantina/uracilo/vitamina C	PTU	-2,2	0,01536
PP_4735	<i>lctP</i>	transportador de L-lactato	PTU	-2,3	0,01381
PP_4863		transportador ABC de aminoácidos ramificados, proteína de unión ATP	PTU	2,0	0,04579
PP_4881		transportador ABC de hierro, proteína periplásmica de unión hierro, probable	PTU	-2,0	0,01822
PP_4946	<i>putP</i>	simportador de sodio/prolina	PTU	2,5	0,00827
PP_5177	<i>potI</i>	transportador ABC de putrescina, proteína permeasa	PTU	-2,0	0,03654
PP_5206		proteína de secreción familia HlyD	PTU	-3,2	0,00299
PP_5207		transportador ABC, proteína unión ATP/permeasa	PTU	-2,3	0,00917
PP_2583		proteína ribosomal-alanina N-acetiltransferasa, probable	SP	-2,1	0,01065
PP_4654	<i>trmA</i>	tRNA (uracil-5-)-metiltransferasa	SP	-2,0	0,04579

Información suplementaria

PP_5089	<i>argS</i>	arginil-tRNA sintetasa	SP	-2,3	0,00550
PP_1623	<i>rpoS</i>	factor sigma RNA polimerasa RpoS	T	2,1	0,01974
PP_4142	<i>rnhA</i>	ribonucleasa H	T	2,2	0,00676

11.3 Tabla de datos de proteómica del crecimiento a 10°C comparado con 30°C

Tabla 14. Proteínas cuyos niveles cambian al crecer las células a 10° C con respecto a 30° C. Sólo se indican aquellas proteínas que presentaban un cambio de al menos 1,5 veces ($P < 0,05$ corregido por FDR). Los valores positivos indican niveles mayores a 10° C respecto a 30°C, y los negativos niveles menores a 10° C (inverso de la razón geométrica). Las abreviaturas utilizadas en la columna “categoría” son: BA: biosíntesis de aminoácidos; BC: biosíntesis de cofactores, grupos prostéticos y portadores; EC: envuelta celular; FD: función desconocida; FR: funciones reguladoras; MAGF: metabolismo de ácidos grasos y fosfolípidos; ME: metabolismo energético; PC: procesos celulares; PH: proteínas hipotéticas; PP: procesamiento de proteínas; PPNN: purinas, pirimidinas, nucleósidos y nucleótidos; PTU: proteínas de transporte y unión; SP: síntesis de proteínas; T: transcripción.

TIGR locus	Gen	Proteína	Categoría	Cambio	T-test	Puntuación	Cobertura %
PP_0838	<i>suhB</i>	Inositol-fosfato fosfatasa	BA	2,7	0,00066	80	19
PP_1025	<i>leuA</i>	2-isopropilmalato sintasa	BA	1,6	0,0071	76	20
PP_1866		fosfo-2-dehidro-3-deoxiheptonato aldolasa	BA	1,6	4,10E-05	642	52
PP_2913	<i>hemB-1</i>	ácido delta-aminolevulínico deshidratasa	BC	1,8	4,40E-05	165	33
PP_4869	<i>nadE</i>	NAD sintetasa	BC	1,6	0,0022	676	57
PP_4993	<i>gshB</i>	glutación sintetasa	BC	1,6	3,30E-05	372	47
PP_0933	<i>mreB</i>	proteína determinante de la forma bacilar MreB	EC	-1,7	2,80E-05	597	53
PP_0957		proteína familia KpsF/GutQ	EC	1,5	2,50E-05	696	56
PP_1185	<i>oprH</i>	proteína de membrana externa H1	EC	-3,0	0,00028	228	53

PP_1784	<i>rmlD</i>	dTDP-4-dehidrorramnosa reductasa	EC	2,2	5,60E-06	113	20
PP_3821	<i>galU</i>	UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa	EC	1,6	0,0029	213	44
PP_2201		hidrolasa, familia plegamiento alfa/beta	FD	1,8	1,40E-06	82	16
PP_2486		flavin oxidorreductasa NADH-dependiente, familia Oye	FD	-2,0	2,30E-08	188	28
PP_4588		nitroreductasa	FD	-1,7	1,10E-05	443	58
PP_5278		proteína familia aldehido deshidrogenasa	FD	2,7	4,00E-06	184	18
PP_1761		proteína proteínas con caja sensorial GGDEF	FR	1,7	3,10E-05	60	13
PP_4693		proteína familia DksA/TraR con dedo de zinc tipo C4	FR	-1,7	7,50E-05	101	30
PP_5324		regulador de respuesta, proteína receptora	FR	-2,0	3,30E-06	112	38
PP_2137	<i>fadA</i>	3-cetoacil-CoA tiolasa	MAGF	1,6	5,90E-05	367	54
PP_3554		proteína familia acil-CoA deshidrogenasa	MAGF	2,4	6,80E-05	410	55
PP_3754		beta-cetotiolasa	MAGF	2,0	4,30E-09	936	76
PP_3755	<i>paaH</i>	3-hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa	MAGF	2,4	8,00E-06	174	35
PP_4175	<i>fabB</i>	3-oxoacil-(proteína portadora acilo)sintasa I	MAGF	-1,7	5,90E-07	578	46
PP_4550	<i>fadD2</i>	acil-CoA sintetasa	MAGF	2,6	3,90E-07	119	25
PP_0322	<i>glyA-1</i>	serin hidroximetiltransferasa	ME	1,9	4,00E-06	170	23
PP_0596		beta alanina-piruvato transaminasa	ME	2,3	7,90E-06	140	27
PP_1009	<i>gap-1</i>	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, tipo I	ME	1,8	2,40E-06	302	61
PP_1011	<i>glk</i>	glucoquinasa	ME	1,6	0,00013	552	66

PP_1022	<i>zwf-1</i>	glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa	ME	1,8	5,60E-07	396	23
PP_1075	<i>glpK</i>	glicerol quinasa	ME	-1,5	2,90E-05	559	67
PP_1143		3-hidroxi-isobutirato deshidrogenasa	ME	1,6	1,80E-06	208	37
PP_1251	<i>mgo-2</i>	malato:quinona oxidorreductasa	ME	-1,7	4,70E-06	667	47
PP_1389		carboxifosfoenolpiruvato fosfonomutasa, probable	ME	-1,9	0,004	475	35
PP_1791		4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa	ME	1,6	0,00067	81	17
PP_1808	<i>pgi</i>	glucosa-6-fosfato isomerasa	ME	1,6	4,10E-06	492	38
PP_1972	<i>tyrB-1</i>	aminotransferasa de aminoácidos aromáticos	ME	-1,8	3,20E-06	1090	76
PP_2334	<i>prpB</i>	2-metilisocitrato liasa	ME	4,1	7,50E-09	531	56
PP_2335	<i>prpC</i>	metilcitrato sintasa, probable	ME	2,4	3,50E-05	128	30
PP_2336		2-metilisocitrato hidratasa	ME	2,2	1,40E-05	151	16
PP_2448		γ -glutamilputrescina oxidasa, probable	ME	6,9	2,20E-07	155	29
PP_3383	<i>gadB</i>	gluconato 2-deshidrogenasa, subunidad aceptora	ME	5,4	6,10E-10	413	28
PP_3416	<i>gnuK</i>	glucoquinasa	ME	2,4	2,50E-06	173	46
PP_3662		proteína familia descarboxilasa	ME	1,7	0,00031	82	25
PP_4012		isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP	ME	1,7	0,0062	162	18
PP_4065	<i>liuB</i>	3-metilcrotonil-CoA carboxilasa, subunidad beta	ME	2,5	2,10E-07	552	53
PP_4120	<i>nuoB</i>	NADH deshidrogenasa, subunidad B	ME	-1,6	2,10E-06	236	32
PP_4123	<i>nuoF</i>	NADH deshidrogenasa, subunidad F	ME	-1,6	1,80E-05	118	18

PP_4124	<i>nuoG</i>	NADH deshidrogenasa, subunidad G	ME	-1,8	1,40E-06	687	45
PP_4126	<i>nuoI</i>	NADH deshidrogenasa, subunidad I	ME	-1,6	3,10E-06	281	36
PP_4190	<i>sdhB</i>	Succinato deshidrogenasa, subunidad hierro-azufre	ME	-1,9	1,50E-06	585	50
PP_4191	<i>sdhA</i>	succinato deshidrogenasa, subunidad flavoproteína	ME	-1,6	0,00018	522	34
PP_4404	<i>lpdV</i>	2-oxoisovalerato deshidrogenasa, componente lipoamida deshidrogenasa	ME	1,7	0,00031	608	53
PP_4487	<i>acsA</i>	acetil-CoA sintetasa	ME	3,5	3,10E-07	261	27
PP_4491	<i>phhB</i>	pterina-4-alfa-carbinolamina deshidratasa	ME	2,8	8,90E-08	245	42
PP_4736	<i>lldD</i>	L-lactato deshidrogenasa	ME	2,2	9,60E-05	61	22
PP_4811	<i>proA</i>	gamma-glutamil fosfato reductasa	ME	-1,9	1,10E-06	500	55
PP_5056	<i>pgm</i>	fosfoglicerato mutasa 2,3-bifosfoglicerato-independiente	ME	-1,9	9,50E-06	915	57
PP_5184		glutamina sintetasa, probable	ME	1,9	0,00066	514	48
PP_5270	<i>dadA-2</i>	D-aminoácido deshidrogenasa (deaminasa)	ME	6,4	7,70E-07	131	15
PP_5289	<i>argB</i>	Acetilglutamato quinasa	ME	-1,5	5,40E-06	592	65
PP_5338	<i>aspA</i>	aspartato amonio-liasa	ME	-1,7	3,30E-05	1000	55
PP_1733	<i>minD</i>	proteína determinante de lugar de septación MinD	PC	-2,2	0,0012	219	48
PP_1794	<i>afpA</i>	proteína anticongelante secretada AfpA	PC	2,1	0,012	453	12
PP_4393	<i>cheV-3</i>	proteína de quimiotaxis CheV	PC	2,0	2,30E-05	490	61
PP_0886		Proteína hipotética	PH	3,7	6,40E-08	114	42

PP_1230		proteína hipotética	PH	1,7	1,60E-05	542	49
PP_2223		Proteína hipotética	PH	-4,2	4,40E-08	162	17
PP_4163		Proteína hipotética	PH	2,2	1,90E-06	227	50
PP_4200		Proteína hipotética	PH	1,7	0,0027	240	48
PP_4293		Proteína hipotética	PH	-4,4	1,00E-06	352	33
PP_5156		Proteína hipotética	PH	1,5	5,80E-06	111	36
PP_0684	<i>fkIB-1</i>	peptidil-prolil cis-trans isomerasa	PP	2,5	5,70E-09	287	36
PP_4179	<i>htpG</i>	proteína de golpe térmico HtpG 90	PP	-2,1	0,012	225	27
PP_4727	<i>dnaK</i>	chaperona molecular DnaK	PP	-1,5	2,40E-06	764	61
PP_5113		proteína con dominio peptidasa M16	PP	1,8	1,60E-05	488	49
PP_0747		Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa	PPNN	-2,4	2,00E-08	375	58
PP_5265	<i>xpt</i>	xantina fosforribosiltransferasa	PPNN	-1,9	4,50E-05	676	85
PP_5296	<i>gmK</i>	guanilato quinasa	PPNN	-1,6	0,0014	254	45
PP_0268	<i>oprQ</i>	porina de membrana externa	PTU	-1,5	2,00E-05	719	59
PP_0283		transportador ABC de aminoácidos, proteína de unión de ATP	PTU	-1,7	4,50E-08	272	50
PP_0482		Bacterioferritina	PTU	1,5	0,0022	59	15
PP_0868		transportador ABC de glicina betaína/carnitina/colina, proteína de unión de ATP, probable	PTU	2,5	3,00E-06	290	40
PP_0870		Transportador ABC de glicina betaína, región de unión sustrato	PTU	1,6	1,80E-06	438	42

PP_0883	<i>opdP</i>	porina de membrana externa	PTU	3,4	3,10E-06	479	42
PP_0884		transportador ABC de dipéptidos	PTU	2,1	1,30E-07	180	17
PP_0885		transportador ABC de dipéptidos, proteína periplásmica de unión dipéptidos	PTU	1,7	1,90E-07	291	31
PP_1015	<i>gtsA</i>	transportador ABC de azúcares, proteína periplásmica de unión de sustrato	PTU	1,8	1,80E-07	208	45
PP_1018	<i>gtsD</i>	transportador ABC de azúcares, subunidad de unión de ATP	PTU	2,8	1,10E-06	400	30
PP_1019	<i>oprB-1</i>	porina B	PTU	1,9	3,80E-06	81	21
PP_1071	<i>aatJ</i>	transportador ABC de aminoácidos, proteína periplásmica de unión de aminoácidos	PTU	3,0	2,90E-06	454	55
PP_1137	<i>braG</i>	transportador ABC de aminoácidos ramificados, proteína de unión de ATP	PTU	1,9	3,00E-05	69	45
PP_1141	<i>braC</i>	transportador ABC de aminoácidos ramificados, proteína periplásmica de unión de aminoácidos	PTU	2,5	8,10E-08	790	50
PP_1206	<i>oprD</i>	porina D	PTU	3,1	4,80E-05	786	34
PP_1222	<i>tolB</i>	proteína de translocación TolB	PTU	-1,6	2,20E-06	681	58
PP_2089	<i>oprF</i>	proteína familia OmpF	PTU	2,0	0,0034	897	66
PP_2454	<i>rbsB</i>	transportador ABC de ribosa, proteína periplásmica de unión de ribosa	PTU	2,1	7,10E-08	408	58
PP_3593		transportador ABC de aminoácidos, proteína periplásmica de unión de aminoácidos	PTU	1,6	0,00018	183	44
PP_3764		porina, probable	PTU	-1,7	7,70E-07	113	16
PP_0452	<i>tuf</i>	factor de elongación Tu	SP	-2,1	2,20E-06	58	27
PP_1641		proteína con dominio lazo-PP	SP	-1,6	2,10E-06	168	44
PP_4874	<i>rplI</i>	proteína ribosomal (50S) L9	SP	-1,9	0,014	91	42

PP_4879		RNA metiltransferasa	SP	1,6	1,60E-07	307	46
PP_4708	<i>pnp</i>	polinucleótido fosforilasa/poliadenilasa	T	1,9	1,20E-07	889	40

11.4 Transcriptómica de la cepa mutante KTCRC a baja temperatura comparada con la cepa silvestre KT2440 también a 10°C

Tabla 15. Genes cuya expresión cambia en una cepa carente del gen *crc* (KTCRC) respecto a la cepa silvestre (KT2440), cuando las células crecen en medio LB a 10° C. Ambas estirpes se cultivaron en medio rico LB a 10° C y se recogieron en fase exponencial (D.O. = 0,6). Sólo se indican aquellos genes cuyos niveles de ARNm cambia al menos dos veces, con un valor de $P < 0,05$ (corregido por FDR). Los valores positivos indican niveles de ARNm mayores en la cepa mutante respecto a la silvestre, y los negativos niveles menores en la cepa mutante con respecto a la silvestre. Las abreviaturas utilizadas son: BAA: biosíntesis de aminoácidos; BC: biosíntesis de cofactores, grupos prostéticos y portadores; EC: envuelta celular; FD: función desconocida; FR: funciones reguladoras; MAGF: metabolismo de ácidos grasos y fosfolípidos; MCI: metabolismo central intermediario; ME: metabolismo energético; PC: procesos celulares; PH: proteínas hipotéticas; PP: procesamiento de proteínas; PTU: proteínas de transporte y unión.

Locus (TIGR)	Gen	Descripción	Función	Subfunción	Cambio	FDR (LiMMA)
PP_3148		glutamino-sintetasa, probable	BAA	Familia glutamato	-2,2	1,9E-03
PP_3781		proteína de la familia Coproporfirinógeno III oxidasa oxígeno-independiente	BC	Síntesis de hemo, porfirina, y cobalamina	-2,0	1,1E-02
PP_4512		proteína de membrana, probable	EC	Otras	3,3	1,6E-04
PP_0310		oxidorreductasa, unión de FMN	FD	Enzimas de especificidad desconocida	-2,3	9,7E-04
PP_1182		sensor histidin-quinasa	FR	Interacciones proteicas	-2,1	1,4E-02
PP_2333		regulador transcripcional, familia GntR	FR	Regulador transcripcional	-4,0	6,3E-06
PP_2457	<i>rbsR</i>	represor del operón de la ribosa	FR	Regulador transcripcional	-2,3	1,5E-03

PP_3319		proteína con caja sensora con dominio GGDEF	FR	Interacciones de moléculas pequeñas	-2,6	6,0E-04
PP_3415		regulador transcripcional, familia LacI	FR	DNA interactions	-2,4	6,7E-04
PP_3552		sensor histidin-quinasa con dominio PAS/PAC	FR	Sensor/histidin-quinasa	-3,7	2,1E-05
PP_3555		sensor transmembrana, probable	FR	Otras	-3,2	7,1E-05
PP_3592		regulador transcripcional, familia RpiR	FR	Regulador transcripcional	-2,3	1,9E-03
PP_3553		Acil-CoA sintetasa	MAGF	Metabolismo lípidos	-10,8	4,0E-08
PP_3554		proteína familia acyl-CoA deshidrogenasa	MAGF	Metabolismo lípidos	-7,8	1,1E-07
PP_3754		beta-cetotiolasa	MAGF	Metabolismo lípidos	-5,5	7,4E-06
PP_3755	<i>paaH</i>	3-hidroxi-butiril-CoA deshidrogenasa	MAGF	Degradación de butanoato	-5,3	7,4E-06
PP_5347	<i>accC-2</i>	piruvato carboxilasa	MCI	Conversión piruvato a oxaloacetato	3,1	7,5E-05
PP_0323	<i>soxB</i>	sarcosina oxidasa, subunidad beta	ME	Aminoácidos y aminos	-2,3	4,9E-03
PP_1009	<i>gap-1</i>	gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa	ME	Metabolismo glucosa y fructosa	2,1	4,7E-03
PP_2334	<i>prpB</i>	2-metilisocitrato liasa	ME	Ciclo 2-metilcitrato	-5,6	5,9E-07
PP_2335	<i>prpC</i>	metilcitrato sintasa, probable	ME	Ciclo 2-metilcitrato	-5,5	5,9E-07
PP_2336		aconitato hidratasa, probable	ME	Ciclo 2-metilcitrato	-5,4	5,9E-07
PP_2337		proteína accesoria 2-metilisocitrato hidratasa, probable	ME	Ciclo 2-metilcitrato	-4,3	6,3E-06
PP_2338	<i>prpD</i>	2-metilcitrato deshidratasa	ME	Ciclo 2-metilcitrato	-3,4	2,1E-05
PP_3416	<i>gnuK</i>	gluconoquinasa	ME	Ruta pentosas fosfato	-4,1	6,5E-06
PP_3596		proteína familia D-aminoácido deshidrogenasa,	ME	Metabolismo de aminoácidos	-2,7	1,6E-04

		subunidad pequeña				
PP_3657		nitrobenzoato reductasa, probable	ME	Otras	2,1	1,8E-02
PP_3745	<i>glcD</i>	glicolato oxidasa, subunidad GlcD	ME	Metabolismo glicolato/glioxilato	-2,7	6,0E-04
PP_3747	<i>glcF</i>	glicolato oxidasa, subunidad hierro-azufre	ME	Metabolismo glicolato/glioxilato	-2,4	2,2E-03
PP_5338	<i>aspA</i>	aspartato amonio-liasa	ME	Metabolismo Ala and Asp metabolism	-2,5	3,2E-03
PP_5346	<i>oadA</i>	oxaloacetato descarboxilasa, subunidad alfa	ME	Fermentación	2,6	9,4E-03
PP_1859	<i>ohr</i>	proteína resistencia hidroperóxidos orgánicos	PC	Detoxificación	2,2	4,0E-03
PP_0153		proteína hipotética	PH	Conservada	2,4	5,6E-03
PP_1020		proteína hipotética conservada	PH	Conservada	-2,4	8,4E-04
PP_1149		proteína hipotética	PH	Proteína hipotética	-2,3	2,8E-03
PP_3418		proteína hipotética	PH	Proteína hipotética	-2,3	4,8E-03
PP_3749		proteína hipotética	PH	Proteína hipotética	-2,0	1,5E-02
PP_3780		proteína hipotética	PH	Proteína hipotética	-3,5	2,4E-05
PP_0308		dipeptidasa, probable	PP	Degradación de proteínas, péptidos, y glicopéptidos	-2,2	3,1E-03
PP_0178		transportador flujo, proteína de fusión de membrana, probable	PTU	Bomba flujo	2,4	3,1E-02
PP_0296		transportador ABC de glicina betaína/L-prolina, proteína periplásmica de unión	PTU	Aminoácidos, peptidos y aminos	-2,4	2,3E-03
PP_0880	<i>dppC</i>	Transportador ABC de dipéptidos, permeasa	PTU	Transporte de aminoácidos	-2,1	5,9E-03
PP_0881	<i>dppB</i>	Transportador ABC de dipéptidos, permeasa	PTU	Transporte de aminoácidos	-2,0	1,1E-02

PP_0882	<i>dppA</i>	Transportador ABC de dipéptidos, proteína periplásmica de unión de dipéptidos	PTU	Transporte de aminoácidos	-2,9	7,5E-05
PP_0883	<i>opdP</i>	Porina de dipeptidos OpdP	PTU	Transporte de aminoácidos	-3,1	4,4E-05
PP_0885		proteína periplásmica de unión de dipéptidos, transportador ABC de dipéptidos	PTU	Transporte de aminoácidos	-2,1	8,0E-03
PP_1206	<i>oprD</i>	porina D	PTU	Porinas	-4,9	1,9E-06
PP_1297	<i>aapJ</i>	transportador general de aminoácidos ABC, proteína de unión periplásmica	PTU	Transporte de aminoácidos	-2,4	6,7E-04
PP_1400		dicarboxylate MFS transporter	PTU	Transporte de ácidos dicarboxílicos	2,3	1,2E-03
PP_2454	<i>rbsB</i>	transportador ABC de ribosa, proteína periplásmica de unión de ribosa	PTU	Transporte de azúcares	-2,6	3,6E-04
PP_2459		D-ribosa piranasa	PTU	Transporte de azúcares	-2,3	1,1E-03
PP_3147		proteína periplásmica de unión de poliaminas, probable	PTU	Aminoácidos, péptidos y aminas	-2,1	3,3E-03
PP_3417	<i>gntP</i>	transportador de gluconato	PTU	Transporte gluconato	-3,1	7,5E-05
PP_3593		transportador ABC de aminoácidos, proteína periplásmica de unión de aminoácidos	PTU	Transporte de aminoácidos	-2,5	5,2E-04
PP_3594		transportador ABC de aminoácidos, permeasa	PTU	Transporte de aminoácidos	-2,2	3,9E-03
PP_3595		transportador ABC de aminoácidos, permeasa	PTU	Transporte de aminoácidos	-2,1	2,8E-03
PP_3597		transportador ABC de aminoácidos, proteína de unión de ATP	PTU	Transporte de aminoácidos	-2,3	1,6E-03
PP_4578		Transportador familia MSF	PTU	Sustrato desconocido	2,5	6,9E-03

12 ANEXO II: ARTÍCULOS PUBLICADOS